

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Charles ALAIS

1^{re} THÈSE

ÉTUDE DE L'ACTION ENZYMATIQUE
DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE. ISOLEMENT
ET COMPOSITION DU CASÉINO-GLYCOPEPTIDE

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 juin 1962 devant la Commission d'Examen :

MM. LEDERER	Président.
TONNELAT	} Examineurs.
PANIGEL	

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Charles ALAIS

1^{re} THÈSE

ÉTUDE DE L'ACTION ENZYMATIQUE
DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE. ISOLEMENT
ET COMPOSITION DU CASÉINO-GLYCOPEPTIDE

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 juin 1962 devant la Commission d'Examen :

MM. LEDERER *Président.*

TONNELAT }
PANIGEL } *Examineurs.*



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie et Cristal.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie vég. (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (S. P. C. N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie générale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).
EPHROSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S. P. C. N.) et Sédim.
GAUTHERET	T	Biologie vég. (P. C. B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).
FORTIER	T	Mécanique exp. des Fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S. P. C. N.).
M ^{lle} CAUCHOIS ..	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ..	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ..	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et Cristallog.
MATHIEU J.-P.	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Biologie animale (P. C. B.).
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.
CHOARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral.
NORMANT	T	Synthèse organique générale.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
DUGUÉ	T	Statistiques Mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.

Doyen..... M. ZAMANSKY.

ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appl
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
M ^{lle} LE BRETON ..	T	Physiologie de la nutrition.
SALEM	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comp
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
GLANGEAUD	T	Géographie phys. et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. P. C.).
PISOT	T	Tech. mathém. de la Phys.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMAN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratig.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
M ^{me} TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Electrotechnique gén.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
M ^{me} HUREL-PY	T	Biologie végétale (PCB):
PIAUX	T	Chimie (M. P. C.).
BRUN	T	Mécan. théorique des Fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
M ^{me} DUBREIL	T	Mathém. (Agrégation).
M ^{me} LELONG	T	Mathématiques (E. N. S.).
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHIEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Physiologie vég. B. M. P. V.
CASTAING	T	Physique (Orsay).
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie.
MOYSE	T	Physiologie végét. (Orsay).
NOIROT	T	Évolution des Êtres org.
PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay).
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucl. et Radioactivité.
TONNELAT	T	Biologie physico-chim.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.).
DODE	T	Chimie (Orsay).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINCHET	T	Biol. vég. S. P. C. N. (Orsay).
ROLLET	T	Chimie (P. C. B.).
M ^{lle} JOSIEN	T	Chimie S. P. C. N.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).
GERMAIN	T	Mécan. théor. des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Phys. fondamentale des Hautes Énergies (Orsay)
BRICART	T	Météorologie et Phys. de l'Atmosphère.

M ^{me} ALBE-FESSARD .	T	Psychophysiologie.	DURAND-DELGA ..	Géologie.
FRIEDEL.....	T	Physique des Solides (Ors).	FRÉON	T Chimie organique (Orsay).
JULIA M.		Études des Molécules	HELLER	T Physiologie végétale.
		naturelles complexes.	TORTRAT	T Calcul des Probabilités.
LENDER.....	T	Biol. animale (SPCN)	CAILLEUX.....	Géologie (S. P. C. N.).
		(Orsay.)	MAGNAN.....	T Physique (S. P. C. N.).
MAGAT		Physico-chimie des radio-	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appl.
		éléments.		à la Chim. théor. et à la
M ^{lle} QUINTIN	T	Électrochimie.		Phys. nucléaire.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	M ^{lle} FOURCROY ...	Biol. végétale (S. P. C. N.).
BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay).	M ^{me} CHOQUET-	
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	BRUHAT	T Méc. analytique et Méc.
CHARLOT	T	Chimie analytique.		céleste.
HAISSINSKY	T	Radiochimie.	M ^{me} VEIL	Physiologie générale.
LEMÉE	T	Physiol. végétale BMPV	LWOFF	T Microbiologie.
		(Orsay).	SIESTRUNCK.....	T Mécan. phys. et expérim.
GUÉRIN	T	Chimie M. P. C. (Orsay).	LACOMBE.....	T Métallurg. des métaux nucl.
CHATELET M.	T	Chimie (P. C. B.).	BROCHARD	T Physique P. C. B. (Orsay).
JEAN.....	T	Physique nucléaire (Orsay)	CABANNES	T Mécanique générale.
MATTLER	T	Physique S. P. C. N.	LESIEUR.....	T Mathématiques M. P. C.
MICHEL L.		Phys. théor. des Htes		(Orsay).
		Énergies (Orsay).	MAZET	T Mécanique générale (Orsay).
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).	CAIRE	Géographie phys. et Géol.
BERTEIN.....	T	Électronique (Orsay).		dynamique.
BOUSSIÈRES		Chimie des Radioéléments	COMOLET	T Mécanique des Fluides.
		(Orsay).	CORABEUF	Physiologie animale.
M ^{me} COUTURE	T	Thermodynamique et Méc.	DELLOUE.....	Physique de l'exosphère.
		physique.	GORENFLOT	Botanique II (Orsay).
ELLENBERGER	T	Géologie appli. s/le terr.	HOUILLOIN	Biologie animale P. C. B.
FRANC		Biol. animale (P. C. B.).	JULIEN J.	Chimie P. C. B.
SCHNELL.....		Botanique tropicale	MALGRANGE.....	T Tech. math. de la Phys.
		(Orsay).	OLIVIER.....	Anthropologie.
STOLKOWSKI		Physiologie générale.	NOZERAN.....	T Botanique II (Orsay).
ACHER		Chimie biol. (Orsay).	BLANC-LAPIERRE ..	Physique (E. N. S. Orsay).
BAUDOIN		Biologie animale P. C. B.	CHEVAUGEON.....	T Botanique (Orsay).
BEAUMONT		Biologie animale SPCN	KAHANE	T Mathématiques (Orsay).
BLAMONT.....	T	Géophysique Ionosphère.	SAMUEL	T Mathématiques E.N.S. fém.
BOURREAU		Botanique.	KOURGANOF	T Astronomie (Orsay).
CURIE D.		Physique (M. G. P.).	THIRY	T Mécanique céleste.

Secrétaire général R. POULLAIN

ÉTUDE DE L'ACTION ENZYMATIQUE DE LA PRÉSURE
SUR LA CASÉINE.
ISOLEMENT ET COMPOSITION
DU « CASÉINO-GLYCOPEPTIDE »

Charles ALAIS

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	II

I^{re} PARTIE : Techniques expérimentales

I — Préparation des substrats, (caséine α).....	19
II — Préparation de l'enzyme (présure cristallisée)	24
III — Méthode d'étude de la réaction de la présure et préparation des produits de la réaction	29
IV — Méthodes de dosage et d'identification	36
V — Méthodes de contrôle de la pureté des préparations protéiques et peptidiques..	45
VI — Composition en acides aminés et méthodes d'étude de la structure chimique..	51

II^e PARTIE : Résultats

VII — Le substrat et l'enzyme.....	61
VIII — La formation des substances azotées non protéiques.....	72
IX — Étude préliminaire des produits de la réaction.....	91
X — Étude de l'homogénéité du caséino-glycopeptide.....	104
XI — Composition du caséino-glycopeptide et de la paracaséine α	110
XII — Contribution à l'étude des structures ; poids moléculaires.....	120

DISCUSSION	126
RÉSUMÉ	139
BIBLIOGRAPHIE	141

AVANT-PROPOS

Notre étude de l'action de la présure sur la caséine trouve son point de départ dans les conclusions d'une précédente série de travaux (1) sur les défauts de coagulation de certains laits ; il semble que la caséine elle-même doit être mise en cause. La nécessité de mieux connaître le processus de coagulation du lait par la présure s'est ainsi imposée ; nous l'avons envisagé sous l'angle biochimique.

Ce travail a été accompli en grande partie à la Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières (Institut national de la Recherche agronomique), que dirige M. G. MOCQUOT. La partie concernant l'étude de la moitié peptidique du « caséinoglycopeptide » a été accomplie en étroite collaboration avec le Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, où M. le P^r C. FROMAGEOT a bien voulu nous accueillir et où M. le P^r E. LEDERER a continué à manifester un grand intérêt à nos recherches. Cette collaboration a été efficace grâce à la bonne volonté et à la compétence de M. P. JOLLES, Maître de Recherches au C. N. R. S.

Au commencement de notre étude, grâce à la Fondation Rockefeller, nous avons eu le privilège de travailler à l'Institut Theodor Kocher, à Berne (Suisse), sous la direction de M. le P^r Hs. NITSCHMANN, dont les travaux sur la caséine sont bien connus.

Nous devons à ces Établissements beaucoup de gratitude et à ces Maîtres, beaucoup de remerciements ainsi qu'à nos camarades travaillant dans la même matière que nous.

INTRODUCTION

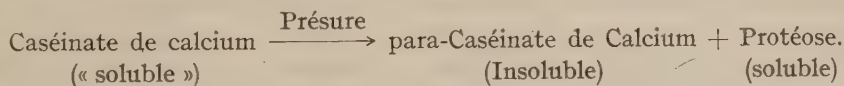
Les premiers travaux importants concernant le mode d'action de la présure sur la caséine ont été faits, il y a bientôt un siècle, par HAMMARSTEN et cependant ce phénomène n'est pas encore complètement élucidé. On ne peut écrire aujourd'hui, comme C. OPPENHEIMER il y a 30 ans (2) : « Mit der Besprechung des Labfermentes treten wir in eines der dunkelsten Gebiete der Fermentlehre ein ⁽¹⁾ » ; mais on doit reconnaître qu'il reste encore des obscurités dans ce domaine. Le but de notre travail est d'essayer d'en dissiper quelques-unes.

Dans la succession des travaux les plus marquants, on peut distinguer quatre étapes principales (2).

1. Reconnaissance de la nature enzymatique de l'action de la présure.
2. Preuves de l'hétérogénéité de la caséine et théorie du colloïde-protecteur, dégradé par la présure.
3. Distinction nette des deux stades de la coagulation et étude du stade enzymatique (réaction primaire) à l'aide de la présure cristallisée.
4. Conception du substrat spécifique, à la suite des nouveaux travaux sur le fractionnement de la caséine (caséine κ).

I. — Avant les publications de HAMMARSTEN il n'y avait que des hypothèses confuses sur le mode d'action des enzymes de coagulation : présure et thrombine. Ce chercheur a montré en 1872 pour la présure (6) et en 1876 pour la thrombine (7) qu'il s'agissait d'actions enzymatiques, provoquant une protéolyse limitée, en milieu neutre, indépendantes du processus de coagulation proprement dit, lequel exige la présence de sels de calcium.

Dans le cas du lait, HAMMARSTEN (8) a appelé « Molkeneiweiss » ou « Molkenalbumose » (en France on dit « Protéose de HAMMARSTEN ») la partie de la caséine qui est détachée par la présure et qui est retrouvée dans le lactosérum ; elle forme environ 5 p. 100 de la caséine originelle. Depuis, l'action de la présure sur la caséine native est représentée sous la forme schématique :



HAMMARSTEN n'a pas étudié la protéose, ni prouvé que sa formation était indispensable à la coagulation. La théorie de HAMMARSTEN a été appuyée par les nombreux travaux de PORCHER (9), avec ses « laits synthétiques » (phosphocaséinate de calcium).

Les progrès dans l'étude du substrat ont souvent précédé ou accompagné les progrès dans l'étude de la réaction. HAMMARSTEN considérait la caséine de vache

(1) « Avec l'étude de la présure nous pénétrons dans un des domaines les plus obscurs de l'enzymologie. »

(2) Outre l'ouvrage de C. OPPENHEIMER, il existe plusieurs revues des connaissances sur la présure et son action : (3), (4) et (5).

comme une protéine homogène (10) ; par une méthode de préparation, qui est encore la plus suivie aujourd'hui, il retrouvait toujours la même composition élémentaire (C = 52,96, H = 7,05, N = 15,65, P = 0,85, S = 0,72, et, par différence : O = 22,78). Cependant dès cette époque l'hypothèse avait été formulée que la caséine est un mélange de plusieurs substances, et, plus tard, un constituant alcool-soluble a été étudié (11).

II. — Une deuxième étape a pour point de départ les travaux des chercheurs du Laboratoire de Carlsberg à partir de 1925. En étudiant la solubilité de la caséine dans l'acide chlorhydrique et l'alcool dilués, LINDERSTROM-LANG (12), (13) a caractérisé 7 fractions : K₁, K₂, K₃... qui se différencient notamment par leur teneur en phosphore et par leur aptitude à précipiter ou à rester en suspension en présence de faibles quantités de calcium. Ayant ainsi montré l'hétérogénéité du substrat, cet auteur, et ensuite HOLTER (14), ont énoncé la théorie la plus satisfaisante du mécanisme d'action de la présure :

« un constituant de la caséine entière (K₃) doit jouer le rôle de « colloïde protecteur » en maintenant à l'état dispersé l'ensemble du caséinate de calcium originel ; la présure, dans un premier stade, dégrade spécifiquement ce constituant, ou le modifie d'une manière telle qu'il devienne inactif ; la suspension colloïdale est détruite et le caséinate de calcium flocule ; c'est le deuxième stade ».

Il est à noter qu'une hypothèse du même genre avait été émise longtemps auparavant par ALEXANDER (15) mais elle faisait intervenir comme protecteur la lactalbumine. Des travaux nombreux, entrepris depuis cette époque, ont apporté des appuis sérieux à la théorie de LINDERSTROM-LANG et de HOLTER, notamment ceux de NITSCHMANN et LEHMANN (16).

Au cours d'une série de travaux commencés en 1932, CHERBULIEZ et coll. ont retrouvé l'hétérogénéité de la caséine en la fractionnant par les sels (17) ; ils ont émis l'hypothèse originale (18) que leur fraction « δ » n'était autre que la protéose de HAMMARSTEN ; celle-ci ne serait donc pas un produit de dégradation de la caséine ; plus tard ils ont précisé leur théorie (19) d'après laquelle la présure séparerait des paracaséines par coupure de liaisons non peptidiques.

Les méthodes physiques d'analyse : ultracentrifugation (20) et électrophorèse (21) ont confirmé l'hétérogénéité de la caséine. Les 3 constituants électrophorétiques de MELLANDER (21) ont été préparés par diverses méthodes (22) (23) : caséines α , β et γ .

III. — Une distinction nette des deux stades successifs du phénomène global de la coagulation a été faite par BERRIDGE (24) ; on peut définir :

a) Un stade enzymatique, au cours duquel la présure attaque la caséine et en solubilise une petite partie ; le coefficient de température Q_{10} est compris entre 2 et 4 ; la réaction n'exige pas la présence des ions calcium ; elle se produit encore à 0°C. On l'appelle également « réaction primaire ».

b) Un stade de coagulation, qui concerne la plus grande partie des substances provenant de la réaction précédente ; le coefficient de température est élevé : 1,3 à 1,6 par degré ; il correspond à une réaction de dénaturation. Cette réaction « secondaire » est extrêmement lente au-dessous de 10°C.

L'étude de la réaction primaire a été rendue plus rigoureuse grâce à l'emploi de la présure pure, que BERRIDGE est parvenu à cristalliser (25). L'interférence d'autres enzymes, notamment la pepsine, était ainsi écartée. Avec des solutions de caséinate

alcalin, on dissocie la réaction primaire de la réaction secondaire. Nous avons apporté une contribution à l'étude de la réaction primaire en mesurant la libération de l'azote non protéique en fonction du temps écoulé après l'emprésurage (ALAIS et coll. 26) ; on peut ainsi distinguer la réaction primaire, qui est spécifique, d'une réaction de « protéolyse générale », qui n'est pas spécifique. Par cette méthode, NITSCHMANN et coll. ont pu étudier la cinétique de la réaction primaire (27) et montrer qu'elle a lieu avec la caséine α et non pas avec la caséine β (28). On n'a pas encore clairement démontré que cette dernière réaction est vraiment une protéolyse. L'étude des résidus N-terminaux de la caséine modifiée par la présure (ou paracaséine) n'a, jusqu'ici, pas apporté de lumière sur cette question.

La paracaséine se distingue de la caséine native par une propriété importante : la sensibilité aux ions calcium. Les physiiciens ont étudié cette transformation. Au début de l'action de la présure sur la caséine il se produit une chute faible, mais brusque de la viscosité (29) (30) ; SONHGEN et coll. l'attribuent à une diminution de l'hydratation de la caséine (29). HAKINSON et PALMER (31) pensent que la première action de la présure entraîne une diminution de l'hydratation et une réduction des charges électrocinétiques, deux facteurs de stabilité ; à ces modifications physiques est attribuée la sensibilité élevée de la paracaséine aux ions calcium. Une telle propriété peut découler de l'action enzymatique et apparaître comme la conséquence de la modification chimique du substrat.

La réaction primaire et la coagulation dans son ensemble, se produisent avec la pepsine comme avec la présure (19) (32) ; mais l'activité de la pepsine est moins spécifique ; elle libère des quantités notables d'azote non protéique avec la caséine β (33), alors que la présure n'en donne que très peu dans les mêmes conditions. (La pepsine est peu utilisée en fromagerie, elle coagule mal le lait frais et elle donne des fromages affinés ayant des propriétés différentes de ceux produits au moyen de la présure.)

Pendant cette période, de nombreux travaux ont été accomplis sur la caséine à l'état natif, sur les relations des différents constituants de la caséine entre eux et avec les sels. Nous ne les mentionnons pas ici, car ils ne sont pas en rapport étroit avec notre sujet (1).

IV. — La dernière étape est celle de la conception d'un substrat spécifique de la présure dans la réaction enzymatique ; conception résultant de nouveaux travaux sur la composition de la caséine. Les fractions de MELLANDER (21) ne sont pas homogènes. La caséine α a été fractionnée à son tour. Les constituants les plus intéressants, à notre point de vue, forment le groupe des caséines « insensibles au calcium » caséine κ (Kappa) de WAUGH et v. HIPPEL (36), caséines α_2 et α_3 de McMEEKIN et coll. (37) (33) et caséine λ de LONG et coll. (39). La distinction entre ces fractions, obtenues par différentes méthodes de précipitation, n'est pas nette. Ce type de constituants s'oppose à celui des constituants sensibles aux ions Ca^{++} , qui précipitent de leur suspension en présence de faibles quantités de calcium : α_s , α_1 , α_R ...

WAUGH a montré que la caséine κ stabilise les autres constituants, vis-à-vis du calcium (36) ; elle empêche leur précipitation. Elle représente environ 15 p. 100 de la caséine entière. Cet auteur a émis l'hypothèse que la présure agirait spécifiquement sur la caséine κ (qui se présenterait ainsi comme le colloïde protecteur

(1) Des revues d'ensemble se trouvent dans les références (3), (34) et (35).

de LINDERSTROM-LANG) et il a donné un schéma hypothétique des micelles de caséine (40). GARNIER (41) puis WAKE (42) ont appuyé cette hypothèse en montrant que la caséine privée de la fraction κ ne donne pas d'azote non protéique sous l'action de la présure.

Notre contribution à l'étude de l'action enzymatique de la présure sur la caséine a pour but de vérifier si la caséine κ se comporte comme un substrat spécifique et de déterminer le mode d'action de la présure par l'étude des produits de la réaction.

Nous avons isolé et purifié le plus important produit soluble de la réaction, nous avons étudié sa composition et, en partie, sa structure. Nous l'avons dénommé : « caséino-glycopeptide ⁽¹⁾ » ; c'est la substance qui forme la presque totalité de la partie non protéique soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concen-

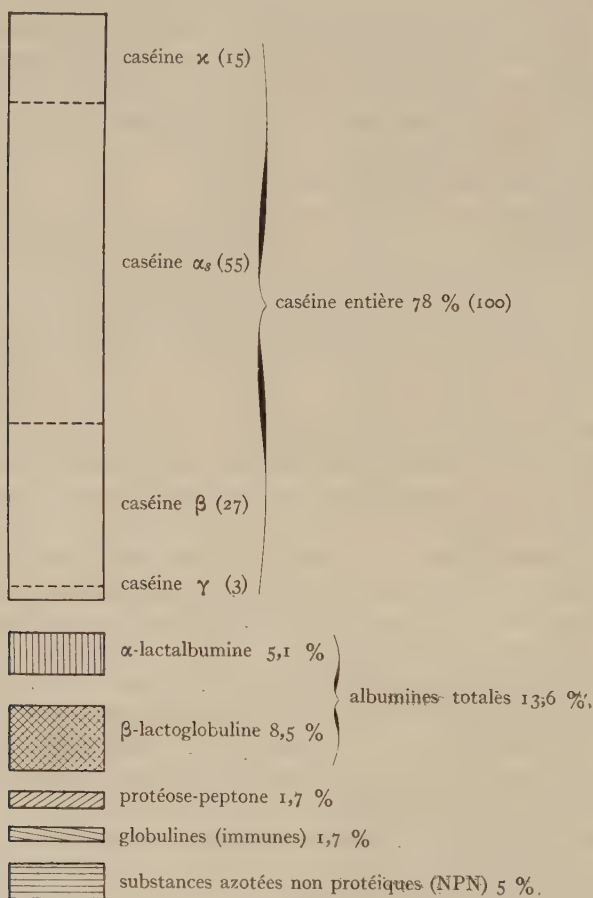


FIG. 1. — La composition azotée du lait de vache.

(1) Auparavant nous l'avions provisoirement désigné par les initiales : NPN-12 % TCA.

tration finale. C'est également le plus abondant des peptides que NITSCHMANN et HENZI (43) ont trouvés dans la partie soluble à pH 4,6 (point isoélectrique de la caséine), après action de la présure sur la caséine entière ou la caséine α .

Nous avons également étudié la caséine κ et la paracaséine κ . Enfin, nous avons fait des expériences comparatives avec la caséine provenant du lait d'autres espèces animales.

Dans la première partie nous décrivons les méthodes de préparation des différentes caséines, de la présure pure et du caséino-glycopeptide, les méthodes de dosage, la méthode utilisée pour suivre le cours de la réaction primaire, les méthodes d'étude de l'homogénéité et de la structure du caséino-glycopeptide.

Dans la deuxième partie nous exposerons les résultats de ces investigations. Enfin, dans la discussion, nous ferons le point de nos connaissances sur le caséino-glycopeptide et sur le mode d'action de la présure.

La composition azotée du lait est rappelée dans la figure 1 ; les nombres représentent des proportions moyennes dans le lait de vache. Les proportions relatives de la caséine entière et des autres substances azotées varient peu dans le lait des ruminants : vache, chèvre, brebis... La proportion de la caséine κ n'a été déterminée (approximativement) que pour la caséine entière du lait de vache (36).

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Observation : Nous exposerons en détail les méthodes de préparation des caséines, de la présure et du « caséino-glycopeptide », qui ne sont pas usuelles. Les méthodes analytiques seront plus brièvement décrites.

CHAPITRE I

PRÉPARATION DES SUBSTRATS

I. — Le lait

La libération de l'azote non protéique a d'abord été étudiée en prenant comme substrat le lait de vache. Nous avons utilisé régulièrement du lait frais de mélange de la traite du matin ⁽¹⁾ après double passage à l'écrémeuse centrifuge et après addition de 0,5 ml de toluène par litre. Le pH de ce lait est voisin de 6,7.

II. — Caséine entière

La caséine étant un mélange de protéines provenant d'un liquide biologique très fragile, il était à craindre que les caséines du commerce soient de qualité irrégulière. Des essais préliminaires ont montré, en effet, que ces caséines ne pouvaient convenir à nos expériences pour l'une des deux raisons suivantes, selon leur origine :

— taux relativement élevé de substances azotées non protéiques, avant action de la présure ;

— pas de libération d'azote non protéique au cours de l'action de la présure.

Il est donc nécessaire de préparer la caséine au laboratoire. De nombreuses méthodes ont été décrites (on les trouvera exposées sous la référence : 44). La plupart dérivent de la méthode originale de HAMMARSTEN (45) ; précipitation de la caséine par acidification du lait écrémé, purification par dissolution dans l'eau avec la plus petite quantité possible d'alcali et reprécipitation par acidification, lavage par l'eau, lavage et déshydratation par l'alcool, puis par l'éther qui dissout les traces de graisses et chasse l'alcool. La méthode a été améliorée (46) en précisant les valeurs du pH à ne pas dépasser : 4,6 et 7,0. Des variantes ont été introduites selon l'usage auquel la caséine est destinée. La purification par redissolution et reprécipitation a été critiquée, car elle provoquerait un abaissement de la teneur en cystéine (47) ; de même, le lavage à l'alcool provoquerait une dénaturation (48) et pourrait extraire des composants alcoolo-solubles (11). Pour notre étude ces éventualités ne sont pas à redouter, comme nous le montrerons plus loin. Nous avons donc préparé la caséine de HAMMARSTEN, selon la même méthode que NITSCHMANN dans ses travaux sur l'action de la présure (16,) (27), etc.

(1) Lait provenant du troupeau du Centre national de Recherches zootechniques, à Jouy-en-Josas.

Toutes les caséines entières que nous avons utilisées pour l'étude du caséino-glycopeptide ont été préparées de façon identique, à partir de quantités de lait variant de 3 à 80 litres.

Voici le mode opératoire pour une préparation de *caséine de vache*.

a) 10 l de lait frais de mélange écrémés, additionnés de 5 ml de toluène, sont mis au bain-marie à 35°C, avec vive agitation mécanique ; on ajoute lentement l'acide chlorhydrique 1 N ; il en faut environ 530 ml pour atteindre pH 4,6 ; durée de l'opération : 2 heures. On sépare le précipité de caséine par centrifugation en pots de 1 l à 3 500 t/mn.

b) Lavage du précipité par agitation dans 3 l d'eau distillée ; contrôle du pH à 4,6 et centrifugation. Ces opérations sont répétées deux fois de suite.

c) Mise en suspension dans 5 l d'eau avec 0,05 p. 100 de toluène, au bain-marie, à 28°C et dissolution par addition lente de soude 1 N, sans dépasser pH 7,0 ; il en faut environ 260 ml ; durée de l'opération : 2 heures ; filtration de la solution sur verre fritté n° 4, pour éliminer les particules insolubles.

d) Reprécipitation à pH 4,6 par HCl 1 N ; il en faut environ 250 ml ; le précipité est séparé par filtration sur papier, dans un entonnoir de Büchner.

e) Les opérations b, c et d sont répétées encore une fois ; il y a donc au total 3 précipitations. Le travail est conduit de telle manière que l'on a en fin de journée un précipité de caséine essoré et conservé la nuit au réfrigérateur à 1°C.

f) Le gâteau de caséine essorée sur Büchner est broyé au mortier avec 1 litre d'alcool absolu. Ce lavage est répété jusqu'à ce que le surnageant indique plus de 95° à l'alcoomètre Gay-Lussac.

g) La caséine déshydratée à l'alcool est agitée avec 1 litre d'éther, 3 fois de suite. Elle est finalement séchée à l'air.

Les *caséines entières de chèvres et de brebis* ont été préparées de la même manière, avec le lait de mélange d'animaux en pleine lactation. La précipitation du lait de brebis, à pH 4,6 exige deux fois plus d'acide que celle du lait de vache : environ 110 ml HCl 1 N par litre de lait.

Rendement :

— 22 g de caséine, par litre de lait de vache ou de chèvre ;

— 50 g de caséine, par litre de lait de brebis.

On a également préparé le caséinate de sodium sec, en lyophilisant la dernière solution de caséine dans la série des opérations précédentes ; donc sans traitement à l'alcool et à l'éther. Avec cette substance on a obtenu les mêmes courbes d'azote non protéique qu'avec la caséine traitée par l'alcool et l'éther.

La caséine sèche, exposée à l'air, contient de 6 à 9 p. 100 d'eau. Avant les pesées pour les analyses et préparations diverses, la caséine est complètement déshydratée dans un dessiccateur à l'anhydride phosphorique.

III. — Caséine α de vache

Nous avons suivi la méthode de fractionnement de la caséine proposée par HIPP et coll. (23) ; elle donne un rendement plus élevé que la méthode antérieure de WARNER (22). Elle exploite les différences de solubilité des trois constituants α , β et γ dans des solutions concentrées d'urée.

La caséine entière, fraîchement précipitée par la méthode décrite ci-dessus à partir de 6 litres de lait de vache, est mise en suspension dans l'eau distillée ; on ajoute une quantité d'urée telle que la concentration soit 6,6 M et le volume final 1 250 ml ; la caséine est amenée à dissolution par agitation, en maintenant la température à 20°C (il se produit un fort refroidissement). On ajoute lentement de l'eau distillée pour abaisser la concentration en urée à 4,65 M. La caséine α précipite sous une forme pâteuse ; par centrifugation (3 600 tours, 20 mn) on sépare le filtrat laiteux (qui pourrait servir à la préparation de la caséine β) du dépôt pâteux. Celui-ci est repris par 600 ml de solution d'urée 6,6 M contenant 6 g NaCl et amené à dissolution. La caséine α est reprécipitée par addition d'eau pour revenir à 4,65 M d'urée ; le précipité est lavé avec une solution d'urée 4,7 M. Pour achever la purification (élimination complète de la caséine β) on répète encore une fois la dissolution et la précipitation. Le dernier précipité est trituré avec de l'eau distillée ; la masse visqueuse se transforme et devient blanche et caoutchouteuse ; on répète cette opération jusqu'à ce que l'eau de lavage ne contienne plus d'urée ; ce que l'on vérifie par la réaction du xanthidrol (49). Ce lavage est très lent étant donné la consistance du dépôt, qui, peu à peu, devient plus friable. Dans une deuxième préparation nous avons maintenu le pH des lavages à 4,6 ; la caséine α est devenue rapidement friable et l'élimination de l'urée plus facile.

Une partie de la caséine α est traitée à l'alcool, puis à l'éther et conservée à l'état sec ; une autre partie est utilisée immédiatement (sans traitement à l'alcool). Nous n'avons pas observé de différence entre ces deux parties en ce qui concerne la réaction de la présure.

Rendement (en substance sèche) :

1^{re} préparation : 34 g p. 100 g de caséine entière ;

2^e préparation : 50 g p. 100 g de caséine entière.

D'après les auteurs (23) le rendement, par rapport à la caséine α contenue dans la caséine entière est de 60 p. 100, soit 45 p. 100 par rapport à la caséine entière.

IV. — Caséine α

La méthode originale de WAUGH (36) pour la préparation de sa fraction S (contenant la caséine α) et la purification de cette fraction, est laborieuse. WAKE a exposé une méthode plus rapide (50), qu'il a encore améliorée par la suite en évitant le passage par la fraction S (51). Ces méthodes consistent à faire varier la concentrations en ions calcium du milieu : à la concentration de 0,3 M CaCl_2 ajouté à la caséine entière en solution, la fraction α se sépare et se retrouve dans le surnageant.

Nous avons schématisé dans la figure 2 la suite des opérations d'une de nos préparations de caséine α . Il est arrivé que le surnageant 1 et le dialysat n° 3 restent troubles après la centrifugation ; dans ce cas nous avons centrifugé une deuxième fois. Nous sommes partis de 80 g de caséine entière de façon à utiliser à pleine capacité le rotor n° 21 de la centrifugeuse « Spino » préparative modèle L (940 ml). Enfin nous avons prolongé la dernière dialyse pour être assuré de la disparition complète de l'urée (5 fois, contre 20 volumes d'eau contenant 0,005 M de NaCl).

Rendement (en substance sèche) : 3 g p. 100 g de caséine entière.

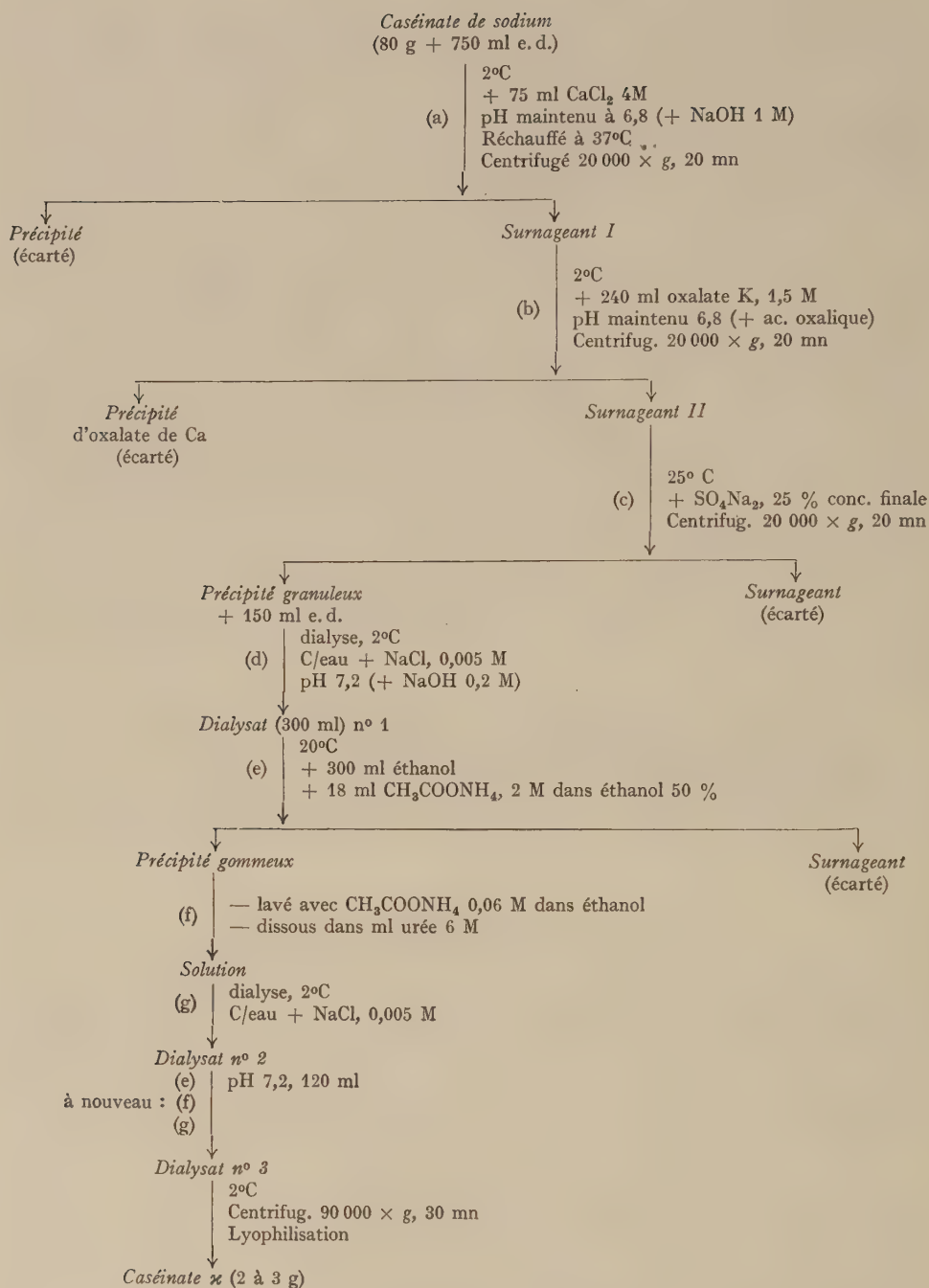


FIG. 2. — Préparation de la caséine x

La caséine α présente le même aspect que la caséine entière ; c'est une poudre blanche amorphe.

V. — Solutions de caséines

Les solutions sont faites dans l'eau, à pH 6,6 — 6,9. La caséine α se dissout dans l'eau sans addition d'alcali. Par contre, pour les caséines entières de vache, de brebis et de chèvre et pour la caséine α de vache il faut ajouter de la soude, environ 0,6 ml NaOH 1 N par gramme de caséine. La dissolution est faite lentement de façon que le pH ne dépasse jamais 7. La solution de caséine doit être utilisée *immédiatement*.

CHAPITRE II

PRÉPARATION DE L'ENZYME ⁽¹⁾

I. — La présure du commerce

Dans le commerce on trouve deux produits, préparés industriellement pour les besoins de la fromagerie : l'« Extrait de Présure » en solution et la « Présure en Poudre » dont l'activité coagulante est dix fois plus grande que celle de l'extrait. Ces produits ne sont pas purs ; ils contiennent d'autres enzymes, notamment un constituant électrophorétique qui migre comme la pepsine (52) ; les courbes d'activité protéolytique en fonction du pH, établies par BERRIDGE (25) (53), montrent la présence d'un enzyme se comportant comme la pepsine.

En 1945 BERRIDGE a obtenu la présure à l'état cristallisé (25), exempte de pepsine. Cette substance n'était pas dans le commerce lorsque nous avons commencé nos recherches. Nous avons entrepris de la préparer nous-mêmes, en suivant la méthode décrite par BERRIDGE et WOODWARD (54), mais nous sommes partis d'une autre matière première. Plusieurs chercheurs utilisant des présures commerciales avaient échoué dans cette préparation et l'opinion avait été émise que la méthode ne pouvait être appliquée qu'à la présure « Benger » dont s'était servi BERRIDGE. Nous n'avons pas utilisé les présures commerciales qui contiennent divers produits chimiques (conservateurs) et souvent des microorganismes et les produits de l'activité microbienne ; nous sommes remontés à la source : la caillette du jeune veau non sevré (caillette ou abomasum) et nous avons opéré en vue d'obtenir un « extrait de présure » aussi pur que possible.

II. — Préparation de l'extrait de présure

Deux douzaines de caillettes très sèches, à peau souple, de couleur claire et d'odeur franche, sont dégraissées au couteau, raccourcies largement du côté du pylore et découpées en lanières. On obtient 1 kg de fragments qui sont mis à macérer, à

⁽¹⁾ Le vocabulaire français est incomplet ; nous ne disposons que d'un seul mot : *présure*, pour désigner les préparations commerciales de ferment coagulant, d'une part, et l'enzyme pur, d'autre part. Les Anglais disent, respectivement : Rennet et Rennin et les Allemands : Lab et Chymosin. Ce dernier terme a été utilisé occasionnellement en France, notamment par PORCHER (9), ainsi que le terme « Lab-ferment ».

30°C, dans 10 litres de solution à 10 p. 100 de chlorure de sodium, avec agitation modérée ; le pH, qui tend à s'élever, est maintenu entre 4,7 et 4,8 par addition d'HCl N. Après 6 heures de macération, le mélange est passé sur tamis pour séparer les peaux. Le liquide trouble est conservé jusqu'au lendemain matin ; l'activité coagulante s'est accrue au cours de la conservation, du fait de la transformation du pro-enzyme (pro-rennin) en présure active, favorisée par le pH bas (55).

Le liquide brut de macération (91) est soumis à une défécation (56) : on ajoute une solution d'alun de potasse à 10 p. 100 pour porter le pH à 3,4 ; il en faut environ 0,5 l. Un précipité abondant se forme, entraînant une partie de la présure. On relève le pH à 5,9 avec une solution de phosphate disodique tiède à 10 p. 100 ; il en faut environ 1 l ; la présure repasse en solution ; les matières mucilagineuses sont précipitées avec le phosphate d'aluminium formé. Après filtration on obtient 9 l d'une solution jaune limpide.

Nous disposons ainsi d'une solution de présure ayant la même activité que l'extrait commercial, mais d'une pureté bien plus grande du fait de l'absence de drogues-antiseptiques et surtout de la brièveté de la macération ; (les industriels font en général des macérations trop longues, durant plusieurs journées ; ils ne distinguent pas l'extraction, qui est assez rapide, de l'activation).

III. — Cristallisation de la présure

La méthode de BERRIDGE et WOODWARD (54) consiste à précipiter à plusieurs reprises la présure par le chlorure de sodium ; on sépare ainsi la pepsine et d'autres impuretés organiques en mettant à profit la faible solubilité de la présure en présence de sel. Dans les solutions trop concentrées en chlorure de sodium, la présure se dépose à l'état amorphe, tandis que dans des solutions de plus faibles concentrations, on peut obtenir la formation de cristaux.

8,5 litres d'extrait de présure sont saturés par le chlorure de sodium ; il en faut environ 250 g par litre. Après une nuit de décantation, on passe le surnageant sur un filtre en papier fort (SCHLEICHER et SCHULL, 2040 b). Le filtre est pulvé au broyeur ; la pâte est lavée à l'eau, sur un filtre en verre fritté ; le liquide obtenu est porté sur le dépôt jaune-brun formé au cours de la décantation précédente. On obtient ainsi 2 l d'une solution qui contient une petite partie insoluble ; on l'élimine sur un filtre en verre fritté. Le pH est amené à 5,4 et l'on sature à nouveau, d'une manière très progressive : le sel est enfermé dans un sac de dialyse qui tourne lentement au sein du liquide. Après 48 heures la densité se fixe à 1,19. La présure se trouve dans le précipité crémeux que l'on sépare par centrifugation à 2 400 t durant 15 mn. On le redissout dans 120 ml d'eau distillée. La solution est trouble ; elle est mise au congélateur. Après plusieurs jours elle ne forme pas de cristaux (BERRIDGE obtient la cristallisation à ce stade). Il faut répéter encore 2 fois la saturation lente pour obtenir un précipité floconneux blanc qui donne dans l'eau une solution limpide ; dans laquelle apparaissent, après plusieurs jours au réfrigérateur, des cristaux abondants.

Nous avons fait une deuxième, puis une troisième cristallisation, au cours desquelles un peu de matière amorphe est séparée.

Rendement, par rapport à l'activité coagulante initiale :

Solution de présure initiale (8,5 l = 470 000 « unités présure ») :	100
1 ^o précipité au sel	68
2 ^o précipité au sel	41
3 ^o précipité au sel	36
Première cristallisation	12,3
2 ^e cristallisation	9,8
3 ^e cristallisation	5,2

IV. — Purification par électrophorèse

Il arrive que l'on ne puisse parvenir à la forme cristalline par la méthode précédente et nous avons rencontré une fois cette difficulté avec une solution de présure provenant de caillettes mal séchées. BERRIDGE (57) ayant montré que la purification peut être achevée par électrophorèse préparative selon TISELIUS ; nous avons appliqué cette technique avec succès. La présure forme le constituant le plus rapide ; on peut ainsi la séparer des impuretés qui migrent plus lentement.

La technique précédente est longue et peu productive ; c'est pourquoi nous avons essayé le procédé de l'électrophorèse sur gélose, sur les conseils de GRABAR (58). L'électrophorèse est faite simultanément dans 8 réservoirs de 0,1 ml, sur une plaque de 18 × 24 cm, supportant une couche de 4 mm d'épaisseur de gélose à 1,5 p. 100 ; solution tampon phosphate de potassium de force ionique 0,05 ; pH 6 ; courant 110 V et 100 mA ; durée 4 h 30 mn ; température du laboratoire. Dans le réservoir un met un mélange en parties égales de présure dialysée contre la solution tampon et de gélose à 3 p. 100, fondue à 42° C.

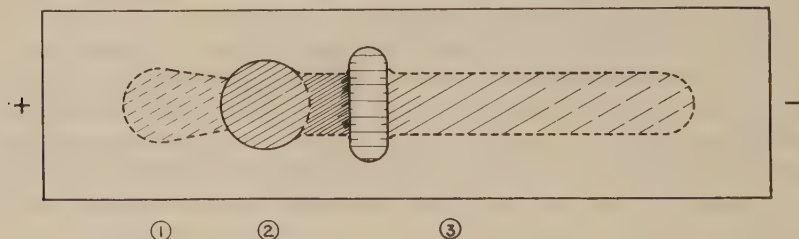


FIG. 3. — Électrophorèse sur gélose de la présure purifiée (59)
pH 6 (phosphate) ; 110 volts ; force ionique 0,05 ; durée 4 heures

Une bande témoin est colorée à l'amidochwarz, après fixation à l'acide acétique. On obtient 3 fractions, comme le représente la figure 3. La présure est concentrée dans la fraction 2, qui renferme 97,6 p. 100 de l'activité coagulante retrouvée après l'électrophorèse. Le rendement est élevé : 47 p. 100 de l'activité de la présure mise en œuvre (présure commerciale simplement purifiée par 2 précipitations au chlorure de sodium (59).

L'extraction de la présure est faite en désagrégeant dans un broyeur de tissus, en présence d'eau, les morceaux de gélose des essais parallèles, au niveau de la fraction 2. La solution ainsi obtenue est concentrée par pervaporation dans un boyau de cellulose ; elle cristallise facilement au réfrigérateur.

V. — Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante est représentée par le rapport entre une quantité de lait et la quantité de présure qui provoque la coagulation en un temps déterminé et dans des conditions fixées arbitrairement. Sa détermination implique la mesure d'un temps de coagulation.

Cette mesure est en principe très simple : on note le temps écoulé entre l'addition de la présure à un volume donné de lait et l'apparition des flocons visibles dans une mince couche de liquide (c'est en fait le temps nécessaire pour la rupture de la suspension colloïdale et non le temps de gélification, lequel est plus grand et de détermination moins précise). On se place dans des conditions bien définies, à une température comprise entre 30 et 40°C.

On peut comparer entre elles des présures différentes en se basant sur la règle de STORCH et SEGELKE (60) : le temps de coagulation (t) est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme (e) ; ce que l'on peut écrire :

$$e \times t = K.$$

Elle n'est vérifiée que dans un intervalle de temps limité, entre 3 et 30 mn environ.

En pratique, l'activité ou « force » de la présure est encore exprimée, d'après SOXHLET (61) : nombre de volumes de lait frais normal que peut coaguler un volume de présure en 2 400 secondes à la température de 35°C. Si l'on prend V ml de lait, v ml de présure et que l'on trouve un temps de coagulation t (en seconde) on calcule :

$$F = \frac{2\,400}{t} \times \frac{V}{v}$$

Le substrat naturel : lait frais normal est un produit très variable ; le temps de coagulation change d'un lait à l'autre, même avec les laits de mélange. Les propriétés de la présure cristallisée et de ses solutions ne sont pas encore assez bien connues, malgré les travaux de FOLTMANN (62), pour que l'on puisse établir un étalon enzyme.

Afin de rendre plus précise la détermination de l'activité, BERRIDGE a conçu un « substrat-standard » (25) : solution de 12 g de lait en poudre (lait écrémé, desséché sans préchauffage par le procédé Spray) dans 100 ml de Cl_2Ca 0,01 M. Les laits en poudre sont plus réguliers dans leur aptitude à la coagulation que les laits frais ; cependant on trouve encore des différences d'un lot à un autre. La solution est stable plusieurs heures à température ambiante. L'excès des ions Ca^{++} permet d'obtenir une meilleure proportionnalité entre le temps de coagulation et l'inverse de la concentration en présure.

D'autre part BERRIDGE a défini les « Unités-présure » (25). Une unité présure correspond à la quantité d'enzyme dissoute dans 1 ml de dilution de présure qui

peut coaguler 10 ml de substrat standard en 100 secondes à 30°C. Avec les mêmes symboles que ci-dessus (calcul de F) on a :

$$UP = \frac{10 V}{t_l v}$$

La relation entre les 2 expressions est $\frac{F}{UP} = 240 \frac{t_l}{t}$.

La comparaison est difficile, car le rapport t_l/t ne peut être donné une fois pour toute étant donné la variabilité de t .

La définition de BERRIDGE mériterait d'être généralisée ; sa technique de mesure a été précisément décrite (63) ; mais il s'est avéré qu'il existe des écarts notables, au point de vue du temps de coagulation, entre les poudres de lait de divers pays. Il nous a paru préférable de faire les déterminations courantes en utilisant un étalon arbitraire ; celui-ci a été titré pendant plusieurs mois sur un échantillon de lait en poudre que nous a fourni BERRIDGE et qui lui avait servi dans ses propres déterminations. Comme étalon nous avons choisi la poudre de présure de la firme HANSEN ⁽¹⁾ (Copenhague), après passage sur un tamis fin. La partie fine présente une stabilité remarquable et l'activité ne varie pas sensiblement d'une fourniture à l'autre. Par comparaison nous en avons fixé l'activité à 457 UP/g (unités présure par gramme de poudre).

Les déterminations courantes ont été faites avec le lait frais de mélange du troupeau bovin du Centre national de Recherches zootechniques, en comparant tous les échantillons examinés à une solution fraîche de présure en poudre HANSEN à 0,2 p. 100 dans l'eau. On opère ainsi : dans des tubes à essai ordinaires, placés dans le bain-marie à 35°C, on mesure 0,5 ml d'une solution de présure à une concentration convenable (C_x) ; on verse rapidement 10 ml de lait se trouvant déjà à 35°C ; c'est le temps 0 ; on note le temps (t_x) au bout duquel on voit apparaître les premiers flocons sur les parois du tube incliné auquel on imprime un lent mouvement de rotation dans le bain-marie. On fait une détermination parallèle avec l'étalon, ce qui donne t_e . On calcule :

$$UP = \frac{t_e \cdot 0,2 \cdot 457}{t_x \cdot C_x}$$

⁽¹⁾ Nous remercions la firme Chr. HANSEN pour la fourniture gracieuse de divers échantillons de présure et pour un don de présure cristallisée, préparée par B. FOLTMANN.

CHAPITRE III

MÉTHODE D'ÉTUDE DE LA RÉACTION DE LA PRÉSURE. PRÉPARATION DES PRODUITS DE LA RÉACTION

I. — Mesure de la libération des substances azotées non protéiques

Principe.

On suit le cours de la réaction de la présure cristallisée sur la caséine en mesurant l'augmentation de la quantité de l'azote non protéique (NPN), c'est-à-dire l'azote restant en solution après la précipitation des protéines, en fonction du temps écoulé depuis l'addition de la présure. On exprime les quantités de NPN en pour cent de l'azote de la caséine se trouvant dans le substrat et l'on trace les courbes $\Delta \text{NPN } f(t)^{(1)}$

L'influence de la nature du réactif déprotéinisant sera discutée avec les résultats.

Technique générale de l'établissement des courbes NPN f (t).

1. Le substrat, dans la plupart des expériences, est une solution de différentes caséines à une concentration comprise entre 1,0 et 4,0 p. 100, préparée comme il a été indiqué précédemment et filtrée sur verre fritté. Quelques expériences ont été faites avec le lait comme substrat : lait de mélange frais et écrémé. On ajoute aux substrats 0,05 p. 100 de toluène.

2. La réaction s'accomplit au bain-marie thermostatique, pour les solutions de caséine, à 25°C en général.

3. On a employé, dans la plupart des expériences, une quantité de solution de présure cristallisée apportant 0,02 unité-présure (soit 0,04 μg d'azote de l'enzyme ou 0,26 μg de présure sèche) pour 1 ml de substrat. Cette proportion correspond aux quantités utilisées dans la pratique fromagère ; c'est-à-dire celles qui peuvent coaguler le lait de mélange en 20 à 30 minutes à 30°C. Dans quelques expériences nous avons modifié la quantité d'enzyme.

⁽¹⁾ Étant donné que les substances azotées non protéiques, libérées par la présure, ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques, il n'a pas été possible de suivre la réaction par la mesure photométrique de l'absorption à 280 m μ .

4. Aux intervalles de temps choisis, en général 5 — 10 — 30 — 60 — 100 et 150 minutes, on prélève une partie aliquote du mélange en réaction (10 à 20 ml) ; on ajoute le volume convenable du réactif déprotéinisant qui précipite la paracaseïne et la caséine non transformées ; on agite vivement et, après quelques minutes, on filtre sur papier. On dose l'azote dans le filtrat par micro-Kjeldahl.

5. Avant l'addition de présure, une partie aliquote du substrat est retirée ; on ajoute de la solution de présure inactivée par la chaleur, dans la même proportion que celle utilisée dans l'expérience et on précipite les protéines, comme ci-dessus ; le dosage de l'azote dans ce filtrat donne la valeur de NPN au temps 0.

Calculs.

La quantité d'azote par ml de solution de caséine : N mg/ml a été déterminée avant l'expérience.

La quantité d'azote déterminée par ml de filtrat, doit être ramenée à 1 ml de solution de caséine, en effectuant une correction pour tenir compte du volume du précipité, (densité de la caséine = 1,3), et en multipliant la valeur trouvée par la dilution due au réactif déprotéinisant ajouté. On obtient n mg/ml.

Si n_0 est la valeur de NPN au temps 0, on calcule aux différents temps d'action de la présure l'augmentation de NPN.

$$\frac{n - n_0}{N} \times 100$$

La quantité de réactif déprotéinisant, selon les expériences, est de 1, 2 ou 4 volumes pour 1 volume de solution de caséine (dilution $\times 2$, $\times 3$ ou $\times 5$).

Dans le cas du lait, l'augmentation de NPN est calculée en p. 100 de l'azote de la caséine et non pas en p. 100 de l'azote total.

Techniques particulières.

a) Dans quelques expériences nous avons chauffé la solution de caséine en la portant 10 minutes à 80°C avant l'addition de la présure.

b) Également dans quelques expériences, nous avons fait un essai témoin en conservant au bain-marie, pendant toute la durée de l'expérience, le substrat sans présure et en déterminant le NPN à la fin.

c) La déprotéinisation a été effectuée de deux manières :

— par l'acide trichloracétique (TCA), la concentration finale étant le plus souvent de 12 p. 100 ; dans quelques expériences on a utilisé des concentrations différentes de 2 à 26 p. 100.

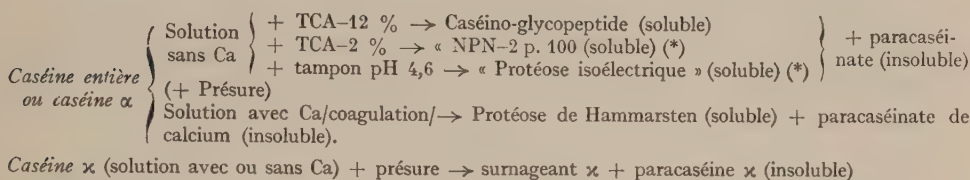
— Solution tampon acétate de soude-acide acétique N/1 à pH 4,6. Dans ce cas le filtrat contenant le N P N est rapidement chauffé à 80°C pendant 5 minutes.

d) Lorsque le lait est utilisé comme substrat, on opère soit au bain-marie à 20°C, alors le mélange en réaction ne coagule pas, soit à 25°C ; dans ce dernier cas il est nécessaire de répartir le mélange en fractions correspondant à chaque prélèvement ; car à cette température le lait coagule.

e) Avec la caséine κ , il se forme sous l'action de la présure un coagulum floconneux et fibreux ; ce qui oblige à répartir le mélange, comme pour le lait.

II. — Préparation du « caséino-glycopeptide »

La figure 4 montre différents modes de séparation des produits de la réaction.



(*) TCA = acide trichloracétique

NPN = substances azotées non protéiques. Le « NPN-2 % » et la « Protéose isoélectrique » contiennent le caséino glycopeptide + d'autres peptides.

FIG. 4. — Séparation des produits de la réaction.

Principe.

Le caséino-glycopeptide se trouve dans le filtrat trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale, où il représente plus de 90 p. 100 du total azoté, avant dialyse. Les impuretés à éliminer sont l'acide trichloracétique et, dans le cas des caséines entières et α , les ions Na (la caséine α est soluble sans addition de soude).

Pour la préparation du « caséino-glycopeptide » pur, nous nous sommes inspirés de la technique utilisée par LORAND (64) pour les fibrino-peptides formés au cours d'un phénomène analogue : l'action de la thrombine sur le fibrinogène.

L'acide trichloracétique a été éliminé par épuisement à l'éther ordinaire. Lorsque nous avons constaté que le caséino-glycopeptide ne dialysait pas à travers les membranes de cellulose ; nous avons employé ce moyen pour terminer la purification.

La figure 5 présente le schéma de la préparation.

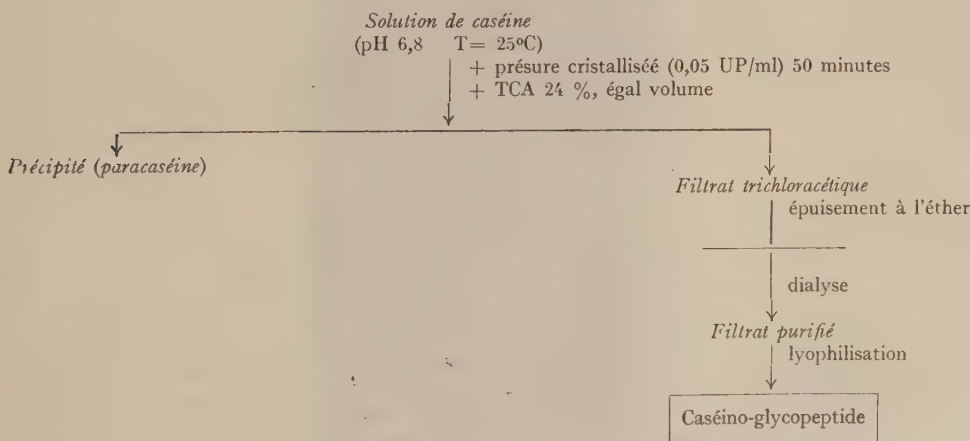


FIG. 5. — Schéma de la préparation du caséino-glycopeptide

Technique de préparation avec la caséine entière et la caséine α .

A. — On prépare 1 litre de solution de caséine à 3,5 p. 100, contenant 0,05 p. 100 de toluène. On emprésure à 25°C comme dans les essais analytiques ci-dessus, avec 50 unités-présure dans 1 ml de solution de présure cristallisée.

On arrête la réaction après une durée correspondant au début du plateau des courbes NPN $f(t)$, entre 40 et 60 minutes, en versant dans le mélange en réaction 1 litre de solution fraîche d'acide trichloracétique à 24 p. 100, avec une vive agitation ; après quelques minutes on fait une première filtration sur verre fritté n° 2 et on repasse le filtrat sur un verre fritté n° 4. On obtient environ 1,9 litre de filtrat.

B. — Aussitôt après la filtration on ajoute 500 ml d'éther ordinaire, on agite modérément dans une boule à décanter, en évitant la formation de couches visqueuses intermédiaires assez stables. On laisse reposer et on sépare la phase aqueuse. On fait ainsi 6 épuisements successifs ; la plus grande partie de l'acide trichloracétique est éliminée avec l'éther, le pH est ainsi remonté de 0,5 à 3 environ.

C. — La purification a été ensuite poursuivie de deux manières. La mise en route de l'une ou de l'autre commence le soir même du jour où toutes les opérations précédentes ont été effectuées :

1. — *Épuisement prolongé à l'éther* dans un appareil que nous avons imaginé pour traiter commodément des volumes assez importants (700 ml) de solution. Il permet de refroidir le liquide en cours d'épuisement et de faire des prélèvements pendant l'expérience. Il est représenté sur la figure 6. L'opération dure en général 6 heures.

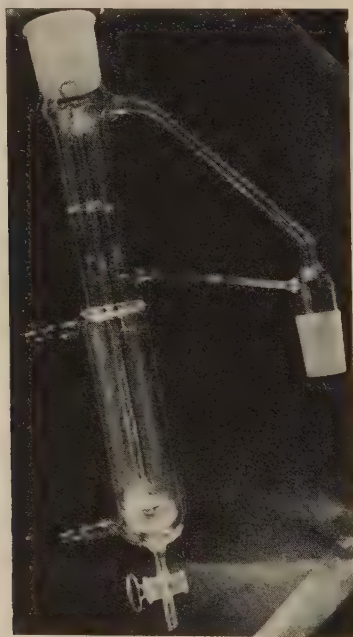


FIG. 6. — Appareil pour extraction à l'éther des filtrats trichloracétiques
Volume extractible : 200 ou 700 ml

Nous contrôlons l'élimination de l'acide trichloracétique par la méthode de MILLS (65) (réaction de FUJIWARA et ROSS, modifiée) : les corps de la forme $R - C X_3$ chauffés à 107°C avec la pyridine et la soude caustique donnent une coloration rouge intense. La réaction est encore nette avec 5 μ g dans la prise d'essai de 5 ml (concentration de TCA : 0,000 1 p. 100).

2. — *Dialyse contre l'eau distillée.* Nous avons employé les boyaux cellulose « Nojax » (Visking), dont le diamètre gonflé est 40 mm ; la dimension des pores est d'environ 24 Å. L'acide trichloracétique, de la solution 12 p. 100, traverse rapidement cette membrane.

Au début de nos recherches nous arrêtons la dialyse après avoir obtenu une réaction de MILLS négative ; soit, en général, après 3 changements d'eau (20 volumes d'eau pour 1 volume de filtrat, changements après : 9 h, 24 h et 48 h).

Plus tard nous avons fait des dialyses plus longues : 8 jours et 8 changements d'eau (9 h, 24 h, 33 h, 2 j, 3 j, 4 j, 5 j, 6 j).

D. — Le produit sec est obtenu par lyophilisation directe des filtrats purifiés. Une préparation a été faite en concentrant sous vide le filtrat, au 1/10, et en précipitant par 8 volumes d'acétone à 20°C.

Rendement.

En grammes se substance sèche obtenue à partir de 100 grammes de caséine :

- avec la caséine entière de vache et de chèvre et la caséine α de vache : 0,8 à 1,1.
- avec la caséine entière de brebis : 3.

Technique de préparation avec la caséine α .

On utilise de plus faibles quantités : 1,5 g de caséine α dissoute dans 100 ml d'eau. 20 minutes après l'addition de la présure la solution de caséine α devient laiteuse, à 30 minutes il se forme un coagulum gélatineux ; à 40 minutes on arrête la réaction en versant 100 ml de solution d'acide trichloracétique à 24 p. 100. Ensuite on continue la préparation comme dans le cas de la caséine entière, en terminant la purification par une dialyse prolongée.

Rendement : 8 à 10 g p. 100 g de caséine α .

III. — Préparation de la paracaséine α

Nous avons dit dans l'introduction que seule la caséine α est dégradée par la présure, agissant sur la caséine entière, dans les conditions habituelles de la coagulation. Si l'on conserve le terme « paracaséine » pour désigner le produit insoluble de la réaction enzymatique, il faut l'appliquer au précipité formé à partir de la caséine α . Il n'y a pas, à proprement parler, de « paracaséine entière » ou de « paracaséine α ».

Technique.

Une solution de 1,5 g de caséine α dans 100 ml d'eau est additionnée de présure cristallisée (0,05 UP/ml) ; après 40 minutes de réaction, le précipité est séparé par centrifugation, puis lavé trois fois par trituration dans l'eau. Pour obtenir une séparation plus complète des substances solubles retenues par adsorption, nous avons dissous le précipité dans l'acide acétique N ; en élevant le pH à 7, la paracaséine reprécipite ; on termine par un nouveau lavage à l'eau.

Rendement.

- Substance lavée à l'eau : 73 g p. 100 g de caséine α .
- Substance lavée à l'acide acétique : 63 g p. 100 g de caséine α .

IV. — Préparation de la fraction azotée soluble dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100*Principe.*

La déprotéinisation par l'acide trichloracétique à 2 p. 100 de concentration finale laisse un filtrat contenant, outre le caséino-glycopeptide, diverses substances azotées qui étaient insolubles dans les conditions de la préparation précédente ; comme nous le verrons dans la deuxième partie.

La production de « NPN (2 p. 100) » dépend du temps d'action et de la concentration en présure, car la courbe de protéolyse est différente de celle que l'on obtient à 12 p. 100.

Technique.

Deux préparations ont été faites, l'une avec la caséine entière, l'autre avec la caséine α . Nous avons suivi la même technique que dans la préparation du caséino-glycopeptide de caséine entière, avec cette seule différence que la déprotéinisation est faite en ajoutant, à la solution de caséine, un volume égal d'une solution fraîche d'acide trichloracétique à 4 p. 100.

Il est à noter qu'au cours de la purification par l'éther un dépôt visqueux se forme sur les parois de l'extracteur ; nous l'avons repris par l'eau et joint à la solution.

Rendement, en substance sèche.

1. — Réaction de 50 minutes, avec 0,066 UP/ml : 2,5 g p. 100 g de caséine α .
2. — Réaction de 120 minutes, avec 0,065 UP/ml : 3,8 g p. 100 g de caséine entière.

V. — Préparation des protéoses

A titre de comparaison, nous avons séparé les produits solubles de la réaction, sans faire intervenir de réactif déprotéinisant.

A. — PROTÉOSE DE HAMMARSTEN

La réaction de la présure sur la caséine entière a lieu en présence de calcium ; il se forme un coagulum, que l'on sépare du sérum par centrifugation.

La caséine entière est dissoute par addition d'eau de chaux saturée (1,65 g Ca (OH)₂/l). La réaction est faite directement dans le bol d'une centrifugeuse « Sharples » de 300 ml, placé dans le bain-marie à 30°C. Avec la présure, dans les mêmes proportions que précédemment, on ajoute 5 mg de calcium (sous forme de Cl₂Ca) pour 100 ml de solution de caséinate de calcium. 10 minutes après la coagulation, on centrifuge pendant 5 minutes à 30 000 t/mn. Le gel de paracaséinate de calcium est collé aux parois du bol. Le sérum contenant la « protéose » est opalescent ; après dialyse il devient limpide. Le produit sec est obtenu par lyophilisation.

Rendement, en substance sèche : 5 g p. 100 g de caséine.

B. — PROTÉOSE ISOÉLECTRIQUE

Le mélange réactionnel de caséine entière et de présure, à pH 6,8, est amené à pH 4,6 par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N (la réaction de la présure a lieu comme dans le cas de la préparation du caséino-glycopeptide) ; le surnageant, contenant la protéose, est dialysé et l'eau est éliminée par lyophilisation.

Rendement (en substance sèche) : 4 g p. 100 g de caséine,

CHAPITRE IV

MÉTHODES DE DOSAGE ET D'IDENTIFICATION ⁽¹⁾

I. — Détermination de la teneur en azote total

Nous avons dosé l'azote par microanalyse Kjeldahl d'après la méthode classique de PREGL, décrite par FRIEDRICH (66), avec quelques modifications. Le catalyseur employé (*a*) contenait du sulfate ferreux, à l'exclusion des sels de cuivre ou de mercure, comme le recommande FOUILLOUZE (67). La distillation de l'ammoniac a été conduite dans un appareil du genre PARNAS et WAGNER (66) que nous avons modifié afin d'éviter toute possibilité de fuite par le robinet d'introduction des solutions ; celles-ci pénètrent dans l'appareil par une dérivation du tube d'arrivée de vapeur. L'ammoniac distillé est reçu dans une solution à 1 p. 100 d'acide borique (*b*) contenant un indicateur mixte (*c*) : vert de bromocrésol + rouge de méthyle (68).

II. — Détermination de la teneur en azote non protéique et en azote de la caséine, dans le lait

Nous avons suivi les techniques décrites par ROWLAND (69) :

— Pour l'azote non protéique : précipitation avec l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale, dosage de l'azote dans le filtrat, comme ci-dessus.

— Pour l'azote de la caséine : précipitation de la caséine par le tampon acétate de soude/acide acétique N à pH 4,6 ; dosage de l'azote dans le filtrat comme ci-dessus ; ce qui donne la teneur en « azote soluble » ; la différence avec l'azote total représente l'azote de la caséine.

Dans les deux cas on tient compte du volume du précipité (densité de la caséine 1,30) dans les calculs, comme nous l'avons expliqué au chapitre précédent.

III. — Dosage du phosphore

On a dosé le phosphore total après digestion par l'acide sulfurique concentré en présence d'eau oxygénée.

(1) La composition des réactifs est indiquée à la fin du chapitre.

Les premiers dosages ont été faits selon la méthode colorimétrique de BRIGGS (70), dans laquelle la formation du bleu de molybdène est obtenue avec l'hydroquinone et le sulfite de sodium. La précision de cette méthode étant insuffisante pour des quantités de phosphore inférieures à 20 μg , nous avons utilisé ensuite une modification de la méthode de FISKE et SUBBAROW proposée par BAMMAN et coll. (71), avec l'acide naphthol-sulfonique 1-2-4 et le bisulfite de sodium ; elle donne de bons résultats entre 4 et 30 μg de phosphore.

Technique.

Le produit de la digestion d'un échantillon (contenant de 5 à 30 μg de phosphore) par 0,5 ml d'acide sulfurique 10 N, est amené à 7 ml par addition d'eau distillée ; on ajoute 0,5 ml de la solution de molybdate d'ammonium à 2,5 p. 100 et 0,5 ml de réactif réducteur (d) ; après 10 minutes on mesure l'absorption au spectrophotomètre à 650 $\text{m}\mu$.

Le phosphore soluble dans l'acide trichloracétique peut être dosé en présence de ce corps.

IV. — Dosage des sucres réducteurs

Les premiers dosages ont été effectués, dans l'hydrolysate chlorhydrique des caséines et des glycopeptides, selon la méthode colorimétrique à l'anthrone, adaptée par RICHARDS au dosage du lactose dans la caséine (72). Nous l'avons essayée parce que les autres substances glucidiques contenues dans les produits que nous avons à analyser ne provoquent pas d'interférences. Cette méthode est basée sur la formation de furfuraldéhyde, par chauffage du sucre avec l'acide sulfurique concentré, et sur la réaction du furfuraldéhyde avec l'anthrone, qui donne une coloration verte. Nous avons obtenu des résultats médiocres, au point de vue de leur reproductibilité ; l'influence de faibles variations du temps de chauffage avec le réactif paraît très importante.

Nous avons ensuite employé une des nombreuses variantes de la méthode qui utilise la réaction des sucres réducteurs avec l'orcinol en milieu acide (réaction de BIAL), aboutissant à la formation d'une coloration rouge. Dans les conditions prescrites par SCHULTZE et coll. (73), nous avons obtenu de bons résultats, avec la lecture à 425 $\text{m}\mu$, pour des quantités de sucre s'abaissant jusqu'à 5 μg . A cette longueur d'onde l'interférence de l'acide sialique est à peine sensible, dans les proportions où nous l'avons trouvé. La gamme de référence est une solution de galactose, de 5 à 100 μg .

Technique.

A 2 ml d'hydrolysate on ajoute 2 ml de réactif (e) et 15 ml sulfurique 70,5 p. 100 ($d = 1,616$) ; on porte 15 minutes au bain-marie à 80°C, à l'obscurité ; on refroidit 10 minutes dans l'eau glacée ; on fait la lecture au spectrophotomètre à 425 $\text{m}\mu$.

Hydrolyse.

Nous avons fait l'étude des conditions d'hydrolyse, sur une préparation de caséino-glycopeptide, avec HCl N, 2 N et 4 N, à 100°C, pendant 3 et 5 heures. Les variations sont faibles ; le maximum de coloration a été obtenu dans les conditions suivantes, que nous avons suivies par la suite, aussi bien pour le dosage que pour l'identification : HCl N, 100°C, 3 h.

V. — Identification des oses

La nature des oses présents dans les caséino-glycopeptides a été mise en évidence par la technique chromatographique sur papier, selon PARTRIDGE (74).

Technique.

L'hydrolysât du caséino-glycopeptide est amené à sec et chromatographié sur papier Whatman n° 1 préalablement lavé au borate 0,2 M (pH 8) ; solvant alcalin : butanol, pyridine, eau (solvant A) ; température 20°C ; durée 20 heures. La révélation est faite par le phtalate d'aniline (f) : 5 minutes à 110°C.

Oses témoins : glucose, galactose, lactose, mannose et fucose (100 µg).

VI. — Dosage des sucres aminés

Les sucres aminés présents dans l'hydrolysât chlorhydrique des caséines et des caséino-glycopeptides ont été dosés par la méthode classique d'ELSON et MORGAN modifiée par RONDLE et MORGAN (75) ; qui consiste à acétyler les osamines, à les transformer en milieu alcalin en dérivés cycliques (oxazoles et pyrroles) et à former entre ces derniers et le réactif d'Ehrlich un composé coloré rose.

Technique.

Dans un tube gradué en ml on mesure 1 ml de l'hydrolysât, on ajoute 1 goutte de phénol-phtaléine et la quantité suffisante de NaOH N pour obtenir le virage rose ; on décolore avec 1 goutte de HCl N ; on ajoute 1 ml du réactif à l'acétyl-acétone (g_1) et de l'eau pour ajuster le volume à 4 ml ; on porte au bain-marie bouillant pendant 20 minutes ; le tube est bouché par une boule de verre à queue, contenant de l'eau. Ensuite on refroidit ; on ajoute 5 ml d'éthanol (distillé sur CaO) et 1 ml de réactif d'Ehrlich (g_2) ; on développe la couleur au bain-marie à 70°C pendant 20 minutes ; on refroidit et mesure l'absorption au spectrophotomètre à 530 mµ.

Observation.

L'acide neuraminique interfère légèrement, en élevant la densité optique. Nous avons fait deux gammes de référence contenant de l'acide N-acétylneuraminique en proportion convenable et de la glucosamine de 5 à 100 µg.

Hydrolyse.

Nous avons fait une étude cinétique avec une préparation de caséino-glycopeptide dans les mêmes conditions que pour les sucres non aminés ; les variations de la production de la couleur sont importantes ; le maximum a été obtenu dans les conditions suivantes :

HCl 2 N, 100°C, 3 h.

Nous avons remarqué que le chauffage d'une solution de glucosamine pure, dans ces conditions, provoque une diminution sensible de l'intensité de la coloration (densité optique pour 50 µg de glucosamine, avant chauffage : 0,43 et après chauffage 0,38).

VII. — Identification des sucres aminés

1^{re} méthode

Nous avons tout d'abord suivi la même technique chromatographique que pour l'identification des oses. La coloration a été développée soit avec le même réactif (*f*) soit avec le réactif à la ninhydrine (*h*). Les témoins sont la glucosamine et la galactosamine (50 µg). Cette dernière substance (origine NBC) ne donne pas une tache nette, il se forme une traînée.

Par cette technique la séparation des deux osamines paraît difficile.

2^e méthode

Nous avons ensuite suivi la méthode STOFFYN et JEANLOZ (76) ; elle permet l'identification sûre des sucres aminés par une réaction spécifique : la ninhydrine dégrade les hexosamines en pentoses de structure correspondante (la glucosamine donne l'arabinose et la galactosamine donne le lyxose).

Technique.

L'hydrolysats du caséino-glycopeptide subit une ionophorèse à pH 6,5, selon la technique qui sera exposée au chapitre suivant. On découpe le papier au niveau de la glucosamine témoin ; on le traite avec la solution de ninhydrine dans l'éthanol et la pyridine (1) ; le papier est suspendu pendant 3 h à 80°C dans un bac clos contenant de la pyridine à 50 p. 100 dans l'eau (v : v). La tache colorée est éluee avec l'alcool 50 p. 100. L'éluat est amené à sec ; il est porté sur une feuille de papier Whatman n° 1 et traité comme indiqué précédemment pour l'identification des oses, mais en prolongeant la chromatographie pendant 40 h. On emploie comme témoin le lyxose et l'arabinose (50 µg).

3^e méthode

L'identification des sucres aminés a été confirmée par chromatographie sur colonne d'amberlite CG 120, selon une méthode mise au point par P. JOLLES (77).

Technique :

L'hydrolysate est chargé sur une colonne d'amberlite CG 120, de $20 \times 1,2$ cm ; l'élution est faite par HCl 0,2 N. Dans les fractions de 1 ml on recherche la présence d'osamine par la réaction de RONDLE et MORGAN (75).

La glucosamine est élue de la colonne avant la galactosamine.

VIII. — Dosage des acides sialiques

Ce dosage a posé un problème qui n'a pas été considéré dans le cas des deux autres composants glucidiques : oses et osamines ; pour lesquelles il existe des méthodes de dosage ayant fait leurs preuves. Jusqu'à ces derniers temps il n'existait pas de méthode assez spécifique pour permettre un dosage précis dans les produits biologiques, où les acides sialiques se trouvent toujours accompagnés d'oses ou d'osamines. Une revue critique des méthodes utilisées a été faite par ZILLIKEN et WHITEHOUSE (78).

Nous avons tout d'abord suivi la méthode de SVENNERHOLM (79) qui est une modification de la réaction de BIAL, utilisant le résorcinol en présence d'un sel de cuivre. Elle comporte en outre un passage préalable de la solution à analyser sur une résine basique, afin de séparer les glucides non acides qui provoquent des interférences.

Plus tard nous avons utilisé une méthode beaucoup plus spécifique et sensible, basée sur la réaction de l'acide thiobarbiturique avec le produit de l'oxydation au périodate des glucides ayant la forme 2-céto-3-déoxy. Cette réaction a d'abord été appliquée au dosage des acides sialiques libres par AMINOFF (80) ; peu après WARREN (81) a donné une technique dix fois plus sensible ; c'est celle-ci que nous avons utilisée.

Technique :

A 0,2 ml de solution à analyser (contenant au maximum 0,05 μ mole d'acide N-acétyl-neuraminique) on ajoute 0,1 ml de la solution de métapériodate (j-1) et 1 ml de solution d'arsénite (j-2) ; il se forme une coloration brune fugace qui disparaît après agitation ; on ajoute alors 3 ml de solution d'acide thiobarbiturique (j-3), on couvre avec une bille de verre et on porte 15 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on extrait la substance colorée par un égal volume (4,3 ml) de cyclohexanone. La densité optique est mesurée à 549 m μ . La concentration est exprimée en acide N-acétylneuraminique (ou O-sialique).

Étalon :

Nous avons tout d'abord utilisé l'acide N-acétylneuraminique isolé de la mucine de la glande sous-maxillaire du mouton, qui nous a été aimablement fourni par le prof. G. BLIX (82). En collaboration avec RIBADEAU DUMAS (83), nous avons ensuite préparé l'acide-N-acétylneuraminique par hydrolyse douce (SO_4H_2 0,03 N) de la caséine entière de vache ; pour la purification nous avons suivi la méthode MARTENSON et coll. (84). Nous avons ainsi obtenu des cristaux en rosettes d'aiguilles

(fig. 7) dont l'absorption molaire est identique à celle de l'acide-N-acétylneuraminique de la mucine ovine : avec le résorcinol : 8 020 et avec l'acide thiobarbiturique : 57 000.

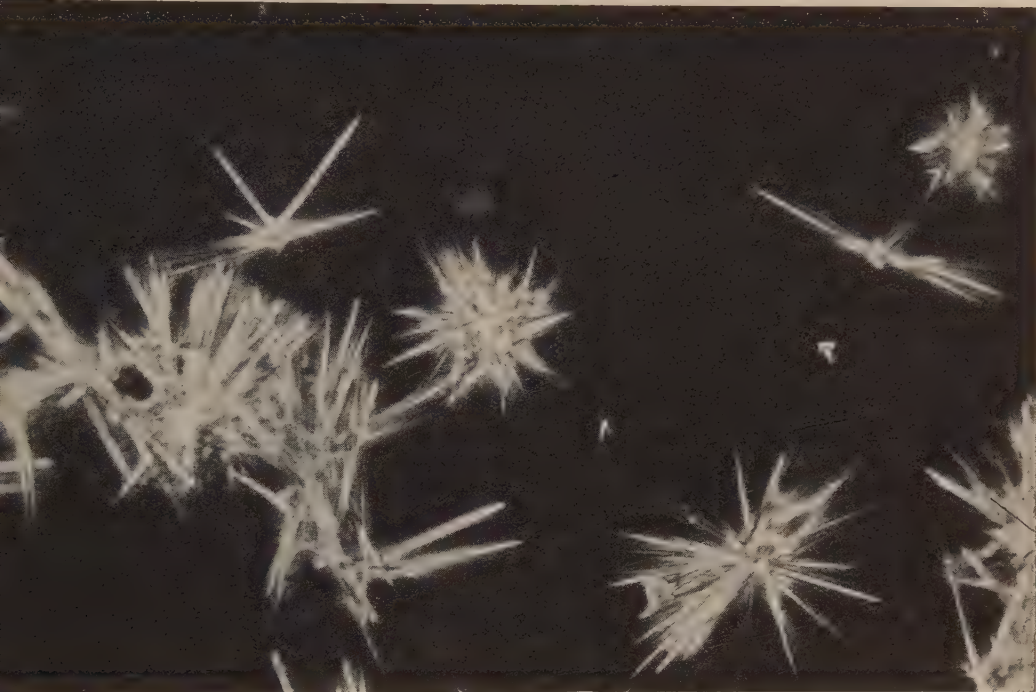


FIG. 7. — Cristaux d'acide O-sialique (N-acétylneuraminique)
Extrait de la caséine (83) (Microphotographie en contraste de phase)

La gamme étalon contient, 3, 6, 9, 12 et 15 μg d'acide N-acétylneuraminique.

Hydrolyse :

La solution à analyser est un hydrolysate sulfurique obtenu selon les indications de SVENNERHOLM (79) : SO_4H_2 0,1 N, 85°C, 1 h.

IX. — Identification des acides sialiques

Elle a été faite par chromatographie sur papier, selon SVENNERHOLM (85), avec un solvant contenant un acide fort pour empêcher la dissociation de l'acide neuraminique qui a un pK assez bas : 2,6 environ.

Technique.

L'hydrolysate (SO_4H_2 0,1 N, 85°C, 1 h) est passé sur une petite colonne ($0,7 \times 5$ cm) de Dowex 50 $\times$ 8 en forme H^+ , puis à la suite, sur une colonne ($0,7 \times 6$ cm) de Dowex I-X₈ en forme formiate qui retient les acides sialiques ; on élue avec

l'acide formique 0,5 N ; l'éluat est amené à sec sous vide en présence de soude, repris 2 fois avec l'eau et desséché à nouveau.

L'hydrolysat purifié est chromatographié sur papier Wathman n° 1 préalablement lavé avec HCl 0,1 N, eau et enfin un mélange de chloroforme + méthanol (2 : 1 v/v). La séparation est faite avec le solvant B (butanol, propanol, HCl) à 20°C pendant 18 heures. Après séchage les chromatogrammes sont révélés par le réactif au résorcinol (k_1) ou par le réactif d'EHRLICH (k_2) sans acide chlorhydrique. Avec le premier réactif, les deux dérivés habituellement rencontrés dans les produits biologiques : N-acétyl et N-glycolyl neuraminique, présentent la même coloration brun-violet ; avec le deuxième réactif, le dérivé N-acétyl est bleu-violet et le N-glycolyl rouge ; les Rf sont nettement différents, respectivement 0,45 et 0,34 (l'acide N-glycolyl-neuraminique nous a été aimablement fourni par le prof. G. BLIX).

X. — Mesure de l'absorption dans l'ultraviolet

1. — L'absorption des filtrats trichloracétiques a été mesurée au spectrophotomètre Beckman DU à 280 m μ , soit dans le liquide acide, soit après alcalinisation par la soude à pH 12,5.

2. — Le spectre des substances préparées a été établi au moyen du spectrophotomètre enregistreur Cary-14, de 190 à 350 m μ . Le pouvoir de résolution de cet appareil est compris entre 0,1 et 0,3 m μ , selon la longueur d'onde. Les substances sont dissoutes dans le tampon phosphate de pH 6,85, à la concentration de 1 mg/ml.

Composition des réactifs.

(a) *Catalyseur de digestion* (Kjeldahl) (67), broyer ensemble :

sélénium métal, en poudre.....	1 g
sulfate ferreux, cristallisé.....	5 g
sulfate de potassium, cristallisé.....	32 g

(b) *Solution pour la distillation de l'ammoniaque* (68) :

acide borique	10 g
éthanol absolu	200 ml
eau distillée	750 ml

Amener à dissolution et ajouter :

— 10 ml indicateur mixte (c)

Si besoin est, ajouter un peu d'alcali (NaOH N/10) pour obtenir une coloration faiblement rougeâtre et compléter à 1 000 ml.

(c) *Indicateur mixte* (screened) (68), dissoudre dans 250 ml d'éthanol absolu :

vert de bromocrésol.....	0,0825 g
rouge de méthyle	0,1650 g

(d) *Réactif pour le dosage du phosphore* (71), dissoudre successivement dans 150 ml d'eau distillée :

métabisulfite de sodium, crist	30 g
sulfite de sodium, cristallisé	1 g
acide amino naphtholsulfonique (1, 2, 4)	0,5 g

Jauger à 200 ml, laisser reposer 24 h, filtrer.

(e) *Réactif à l'orcinol* (73) :

Dissoudre 2 g d'orcinol dans 50 ml eau et compléter à 100 ml avec l'acide sulfurique 53 p. 100 ($d = 1,425$).

(f) *Révélation des oses et osamines* (74)

aniline	0,93 ml
anhydride phtalique	1,48 g
butanol saturé d'eau	100 ml

(g) *Réactifs pour le dosage des sucres aminés* (75)

(g₁) — acétylacétone 1 ml

Dissoudre dans 50 ml d'une solution de carbonate de sodium 0,5 N.

(g₂) *Réactif d'EHRLICH*

— Para-diméthylaminobenzaldéhyde 0,8 g.

Dissoudre dans 30 ml d'éthanol sec ; ajouter 30 ml HCl concentré ($d = 1,18$).

(h) *Réactif à la ninhydrine*

ninhydrine	1,2 g
<i>n</i> -butanol	96 ml
acide acétique	4 ml

(j) *Réactifs pour le dosage de l'acide neuraminique* (81)

j₁ — méta-pétrodate de sodium : 0,2 M dans l'acide phosphorique 9 M.

j₂ — arsénite de sodium : 10 p. 100 dans une solution 0,5 M de sulfate de sodium dans l'acide sulfurique 0,1 N.

j₃ — Acide thiobarbiturique : 0,6 p. 100 dans une solution 0,5 M de sulfate de sodium.

(k) *Réactifs pour la révélation des acides neuraminiques* (85)

k ₁ — résorcinol	1 g
acide trichloracétique	15 g

Dissoudre dans 20 ml du mélange éthanol-eau (1 : 1) contenant du sulfate de cuivre 0,1 M, puis diluer avec 60 ml *n*-butanol.

k ₂ — para-diméthylaminobenzaldéhyde	0,5 g
acide trichloracétique	5,0 g

Dissoudre dans 20 ml du mélange éthanol-eau (1 : 1), puis diluer avec 60 ml *n*-butanol.

(1) *Réactif pour l'identification des sucres aminés (76)*

Ninhydrine 2 p. 100, dans éthanol à 95 p. 100 contenant 4 p. 100 de pyridine.

Solvants pour la chromatographie sur papier.

A (74) *n*-Butanol, pyridine, eau (5-3-2 en volume).

B (85) *n*-Butanol, *n*-propanol, HCl 0,1 N (1-2-1 en volume).

CHAPITRE V

MÉTHODES DE CONTROLE DE LA PURETÉ DES PRÉPARATIONS PROTÉIQUES ET PEPTIDIQUES

Les différentes caséines constituant le substrat ont été examinées par la méthode électrophorétique en phase liquide de TISELIUS. Nous avons également fait des examens au moyen de l'électrophorèse sur papier

Les substances peptidiques formées au cours de la réaction de la présure ont été étudiées par différentes méthodes d'analyse ; outre les deux mentionnées ci-dessus, nous avons utilisé la chromatographie sur papier et la chromatographie sur résines échangeur d'ions.

Du fait de leur mode de préparation, la plupart des produits examinés : caséines et peptides, sont exempts de sels. Les fractions provenant de la chromatographie sur résine ont été dessalifiées.

I. — Électrophorèse selon TISELIUS

Les examens ont été faits avec l'appareil « Fokal B » fabriqué par STRUBIN, au Laboratoire d'Électrophorèse du Centre national de la Recherche scientifique. Cet appareil a été décrit par WIEDEMANN (86). Les conditions expérimentales sont restées sensiblement les mêmes dans les diverses expériences : intensité 20 mA ; tension appliquée 250-270 volts ; gradient de potentiel dans la cellule 7 à 9 volts/cm ; température du thermostat + 3°C ; conductibilité du tampon à cette température — 0,003 2 ohm⁻¹/cm.

On a employé des solutions tampons de force ionique 0,1. La plupart des examens ont été faits à pH 8,6 soit avec le tampon véronal/véronal sodique de LONGSWORTH (n° 1), soit avec le tampon véronal/HCl/NaCl de MICHAELIS (n° 2) (87) ; quelques essais ont été faits dans la zone acide avec le tampon glyocolle/HCl (n° 3) ou avec le mélange HCl/NaCl (n° 4).

II. — Électrophorèse sur papier

A) Les premières analyses ont été faites selon la méthode de GRASMANN et HANNIG (88), avec l'appareil Elphor. Sur la bande de papier Whatman n° 1 de 32 × 5 cm on dépose 20 µl d'une solution à 2 p. 100 de la substance à examiner ; l'électropho-

rèse est conduite à différents pH, dans le tampon Véronal sodique-HCl (n° 5) ; la tension aux bornes est 110 volts pendant 8 heures pour les peptides et 75 volts pendant 15 heures pour la caséine. La bande est séchée et colorée par le réactif à l'amidoschwarz (*m*) ou par le réactif à la ninhydrine (*h*).

B) Une meilleure séparation a été obtenue plus tard en employant la méthode de KUNKEL et TISELIUS (89) avec les tampons volatils de RYLE et coll. (90).

La substance est placée au milieu de la feuille de papier Whatman n° 1 de 23×50 cm, à côté d'une solution témoin contenant : arginine, glycolle et acide cystéique. La feuille est mouillée par le solvant et serrée entre deux plaques de verre pour empêcher l'évaporation ; la tension aux bornes est de 750 volts pendant 2 heures (gradient de potentiel 15 V/cm). La feuille est séchée et colorée par le réactif à la ninhydrine (*h*).

Pour chaque analyse nous avons fait successivement deux ionophorèses avec les solvants C (pH 6,5) et D (pH 3,6).

III. — Chromatographie sur papier

Les premières chromatographies ont été faites par ascension du solvant sur une feuille enroulée de papier Whatman n° 1, selon la description donnée par LEDERER (91). Ensuite nous avons employé la chromatographie descendante avec le papier Whatman n° 1. Trois solvants ont été utilisés : E₁ (butanol-acide formique) ; E₂ (butanol-acide acétique), utilisé par NITSCHMANN et HENZI (43) et F (phénol-eau). La chromatographie est faite à 22°C, pendant 16 heures avec le solvant E et pendant 20 heures avec le solvant F. Les feuilles sont colorées par le réactif à la ninhydrine (*h*).

IV. — Chromatographie sur colonnes de résine échangeur de cations

Cette méthode a été employée pour l'étude du caséino-glycopeptide provenant des caséines de vache et de chèvre ; elle a été appliquée à des préparations qui paraissent être homogènes selon les méthodes précédentes.

A) Nous avons d'abord employé des colonnes de résine carboxylique échangeur de cations, l'*amberlite XE-64* (qualité laboratoire de IRC-50) selon les indications de HIRS (92) ; car cette technique avait déjà été appliquée à des substances peptidiques de poids moléculaire élevé. Nous avons utilisé des colonnes de $24 \times 1,2$ cm pour une charge de 5 mg de substance à chromatographier. L'élution a été faite avec la solution tampon de phosphate depuis 0,2 M et pH 6,5 jusqu'à 0,1 M et pH 5,5. Les substances n'étant pas retenues sur la colonne, nous avons ensuite utilisé les méthodes suivantes :

B) La chromatographie est faite sur des colonnes de Dowex 50, échangeur de cations portent des groupes sulfoniques, avec gradients de pH et de molarité selon la technique de HIRS, MOORE et STEIN (93). Nous avons utilisé la qualité 50-X2 dont le faible « cross linkage » permet de retenir des substances de poids moléculaire assez élevé.

Technique :

La résine est préalablement lavée par HCl N et NaOH N ; elle est tamisée humide à travers des tamis calibrés ; nous avons pris pour remplir les colonnes, selon les indications de JOLLES-THAUREAUX (94), un mélange à parties égales de la fraction passant à 120 et retenue à 200 « mesh » (soit entre les ouvertures 0,125 et 0,074 mm) et de la fraction passant à 200 et retenue à 400 « mesh » (entre 0,074 et 0,037 mm). La résine est lavée par NaOH 0,2 N puis tamponnée à pH 5,1 0,2 N avec la solution tampon n° 6, avant d'être introduite dans la colonne..

Nous avons utilisé deux sortes de colonnes : $24 \times 1,5$ cm pour des essais analytiques, avec une charge de 5 mg de substance, et $130 \times 1,3$ cm pour des essais préparatifs, avec 50 mg de substance. La colonne est lavée par la soude 0,2 N contenant 0,5 p. 100 de solution de Brij 35 (alcool polyoxyéthylène laurique) obtenue en dissolvant 50 g de ce produit dans 100 g d'eau chaude ; puis la résine est tamponnée à pH 3,1 0,2 N avec la solution tampon n° 7. La colonne est placée dans une gaine avec circulation d'eau à 30, 35 ou 50°C, au-dessus du collecteur de fractions. On recueille des fractions de 2 ml pour la petite colonne et de 5 ml pour la grande. La vitesse d'écoulement est 10 ml par heure.

Le caséino-glycopeptide est dissous dans une solution de tampon acétate à pH 6,6 0,2 N (solution n° 9 diluée 10 fois) ; le pH est ramené ensuite à 2,2 avec HCl 0,2 N, (la substance se dissout mal à pH 2,2 directement). La solution est placée sur la colonne. La solution tampon arrive sur celle-ci par un dispositif permettant la réalisation d'un gradient, avec une chambre de mélange de 100 ml ou de 300 ml selon la grosseur de la colonne.

L'élution est, en général, faite de la façon suivante :

- a) passage de la solution tampon n° 7, pH 3,1 0,2 N à 35°C ;
- b) mise en route d'un gradient de pH 3,1 0,2 N à pH 5,1 2 N, avec la solution tampon n° 8 à 35°C.
- c) gradient de pH 5,1 2 M à pH 6,6 2 M, avec la solution tampon n° 9 à 50°C ;
- d) passage de la solution NaOH 0,2 N à 35°C.

La localisation des substances azotées dans les fractions est faite par la méthode à la ninhydrine, selon MOORE et STEIN (95) sur 0,3 ml de chaque fraction, après hydrolyse alcaline : 2 h 30 mn à 90°C avec NaOH 2,5 N. Le dosage est également fait, sans hydrolyse, dans les fractions qui ont donné un résultat positif après hydrolyse.

Le dosage est effectué de la façon suivante : à 0,3 ml de fraction on ajoute 1 ml du réactif à la ninhydrine (*n*) ; on porte 15 mn au bain-marie bouillant ; on ajoute à chaque tube 5 ml d'alcool à 50 p. 100 et la coloration est lue au spectrophotomètre Beckmann B à 570 m μ . On fait un étalonnage avec la leucine ; les lectures de densité optique sont converties en équivalent leucine ; elles permettent de tracer le diagramme de la chromatographie.

Dans le cas du dosage après hydrolyse alcaline, le volume est réduit à 0,2 ml environ ; on ajoute 1 ml d'acide acétique 30 p. 100 (en volume) de façon à ramener le pH vers 5,0 ; le dosage est continué comme ci-dessus.

Les fractions correspondant à un « pic » sur le diagramme de chromatographie sont réunies et dessalifiées.

V. — Chromatographie sur colonne de résine échangeur d'anions

Afin d'obtenir des renseignements complémentaires sur l'homogénéité de nos peptides, nous avons poursuivi leur étude avec la méthode chromatographique décrite par BOMAN et WESTLUND (96). Elle met en œuvre une résine portant des groupes actifs ammonium quaternaire, Dowex II ; l'élution est faite par palier (« Stepwise ») au moyen de solution tampons neutres ou acides de molarités croissantes. Ces auteurs ont ainsi obtenu de bons résultats dans l'étude de diverses protéines : albumine sérique, enzymes, etc.

Technique :

La résine Dowex II-X8, 200-400 mesh, est traitée par HCl 1 N ; on élimine les gaz sous vide et on lave par l'eau. On remplit la colonne de dimensions $24 \times 1,2$ cm ; on fait passer le tampon de départ, environ 100 ml ; la colonne est prête ; elle peut servir de nombreuses fois consécutives ; il suffit de faire passer HCl 1 N entre deux opérations.

Pour le développement de la chromatographie nous avons utilisé comme solution tampon, soit le THAM/HCl (tris-hydroxy-méthyl-aminométhane) à pH 7,3 avec des molarités allant de 0,04 à 0,25 M (n° 10) soit le cacodylate de sodium/HCl à pH 7, de 0,05 à 0,5 M (n° 11) soit l'acétate de sodium à pH 5,4 de 0,1 à 0,5 M (n° 12). Les meilleures séparations sont obtenues avec le THAM.

La localisation des substances azotées dans les fractions est faite par la méthode à la ninhydrine, décrite précédemment. Avec la solution tampon au THAM une difficulté s'est présentée du fait que ce corps réagit avec la ninhydrine en donnant une coloration brune, différente de celle que donnent les substances peptidiques. Une double lecture, pour chaque dosage, à 570 m μ et à 500 m μ a permis de connaître la quantité de substances azotées présente ; en effet, la solution de THAM ayant réagi avec le réactif présente la même absorption à ces deux longueurs d'onde, alors qu'avec les substances azotées l'absorption est maximum à 570 m μ et proche du minimum à 500 m μ .

La chromatographie a été faite à la température du laboratoire (20°C) ; deux expériences ont été faites à la chambre froide à + 4°C ; les résultats sont les mêmes.

VI. — Dessalification des fractions provenant des chromatographies sur colonne

Les substances peptidiques se trouvent dissoutes dans les solutions tampons ; on a éliminé les sels par deux moyens, afin d'obtenir une solution pure de ces substances pour les examens ultérieurs : rechromatographie sur colonne, ionophorèse, analyse chimique.

I. — DESSALIFICATION SUR RÉSINES

a) Les fractions éluées à pH 3,1 sont passées sur la résine basique, Dowex 11-X8, selon la technique établie par DREZE et BOECK (97). La résine qui passe à travers le tamis de 120 mesh (ouverture 0,125 mm) est traitée successivement par l'eau,

HCl N, NaOH 2 N décarbonatée, eau ; elle est placée ensuite dans une colonne de 25×2 cm. On passe 30 ml HCl N, puis 60 ml eau et enfin 60 ml NaOH 2 N décarbonatée. La fraction à dessalifier est chargée sur la colonne ; on lave par 100 ml d'eau et on élue la substance par l'acide acétique N en recueillant des fractions de 5 ml. Lorsque le front de l'acide atteint le bas de la colonne, on le remplace par une solution d'acétate d'ammonium N acidifiée à pH 3 avec l'acide acétique. On localise les substances azotées par un dosage à la ninhydrine, après hydrolyse alcaline, comme indiqué plus haut. Les parties contenant ces substances sont obtenues à l'état sec dans un dessiccateur sous vide, en présence de soude.

b) La dessalification sur la résine Dowex 50-X2, selon JOLLÈS et coll. (98) a été employée pour les substances peptidiques éluées après la mise en route du gradient et également pour celles qui ont été éluées à pH 3,1 et qui n'ont pas été retenues entièrement sur la colonne de Dowex II, au cours de la précédente dessalification. La résine tamisée entre 120 et 200 mesh (0,125-0,074 mm) est traitée comme pour l'analyse chromatographique (voir plus haut) et placée dans une colonne de 25×2 cm ; elle est lavée successivement par NH_4OH 2 N, eau, acide citrique 0,1 M jusqu'à pH 3. La solution à dessalifier est chargée sur la colonne ; on passe 100 ml d'eau et on élue avec NH_4OH N ; on recueille des fractions de 5 ml. Lorsque le liquide au bas de la colonne est devenu alcalin, on passe la solution d'acétate d'ammonium 0,2 N. On localise les substances azotées comme il a été dit précédemment. Les parties de l'éluat de dessalification qui les contiennent sont évaporées à sec, sous vide, dans un dessiccateur en présence d'acide sulfurique.

2. — DIALYSE

La fraction qui sort de la colonne de Dowex 50-X2, au début de l'analyse du caséino-glycopeptide, est difficile à dessalifier. Un essai de dialyse contre l'eau, à travers une paroi de cellulose « Nojax » (chap. III), a montré que l'on peut éliminer les sels et retrouver de 70 à 90 p. 100 de l'azote, selon la durée de la dialyse. Quelques purifications ont été accomplies de cette manière : 1 volume de la fraction est mis à dialyser contre 20 volumes d'eau glacée, avec 4 changements d'eau en 48 heures.

Composition des solutions tampons

A. — Pour l'électrophorèse.

- n° 1 (pH 8,6, $\mu = 0,1$) ; pour un litre : véronal 3,70 g ; véronal sodique 20,6 g.
- n° 2 (pH 8,6, $\mu = 0,1$) ; pour un litre : véronal sodique 5,88 g ; acétate de sodium 3,88 g, HCl 0,1 N 40 ml. ; NaCl 3,28 g.
- n° 3 (pH 3,0, 0,2 M) ; pour un litre : glycolle 0,2 M 57 ml ; HCl 0,2 M 250 ml.
- n° 4 (pH 2,35, $\mu = 0,1$) ; solution de NaCl 0,095 N contenant HCl 0,005 N.
- n° 5 (pH variable) — solution A : véronal sodique 20,6 g/l ;
— solution B : HCl 0,1 N.

On mélange à 100 ml de A un volume convenable de B pour atteindre la valeur de pH désirée.

B. — *Pour la chromatographie sur résine.*

- n° 6 (pH 5,1-0,2 N) ; solution n° 8 diluée 10 fois.
 n° 7 (pH 3,1-0,2 N) ; pour 1 litre : acide citrique H_2O 21 g ; NaOH pur 8,3 g ; HCl conc. 11,5 ml ; Brij 35 (50 g + 100 ml eau) 5 ml.
 n° 8 (pH 5,1-2 N) ; pour 1 litre : acide citrique H_2O 105 g ; NaOH pur 47 g ; acide acétique pur 21,5 g ; acétate de sodium 3 H_2O 136 g, Brij 35 1 ml.
 n° 9 (pH 6,6-2 N) ; pour 1 litre : acétate de sodium 3 H_2O 272 g amené à pH 6,6 par l'acide acétique pur ; Brij 35,1 ml.
 n° 10 Trishydroxyméthyl-aminométhane (Sigma), solution stock 1 M : 121 g sont dissous dans 800 ml d'eau ; on ajoute HCl concentré pour obtenir pH 7,3 et on complète à 1 l. Cette solution est diluée par l'eau pour obtenir la molarité désirée ; le pH change peu, au maximum $\pm 0,1$.
 n° 11 Cacodylate de sodium, solution stock 0,5 M : 107 g sont dissous dans 800 ml d'eau ; on ajoute HCl concentré pour obtenir pH 6,8 et on complète à 1 l.
 n° 12 Acétate de sodium, solution stock 0,5 M : 68 g du sel RP (PM = 136) sont dissous dans 800 ml d'eau, on ramène le pH à 5,4 par addition d'acide acétique pur et on complète à 1 litre.

Solvants pour la chromatographie et l'électrophorèse

- C. — (pH 6,5) : pyridine 100, eau 900, acide acétique 4 (en volume) ;
 D. — (pH 3,6) : pyridine 10, eau 890, acide acétique 100 (en volume) ;
 E₁. — *n*-butanol 75, acide formique 15, eau 10 (en volume) ;
 E₂. — *n*-butanol 40, acide acétique 15, eau 50 (en volume) ;
 F. — Phénol neige fondu 600 ml, cupron 0,4 g, eau 400 ml.

Composition des réactifs

- m.* — Amidoschwarz pour la coloration des bandes d'électrophorèse ;
 — solution à 2 p. 100 d'amidoschwarz 10 B dans le méthanol-acétique (9 : 1 en volume) ;
n. — réactif à la Ninhydrine pour le dosage des acides aminés ;
 — il contient par ml : ninhydrine 20 mg, hydrindantine 3 mg, dissous dans 0,75 ml de méthylcellosolve et 0,25 ml de tampon acétate 4 M à pH 5,5 ; (54,4 g acétate de sodium, 10 ml acide acétique pur, volume final 100 ml).
-

CHAPITRE VI

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS ET MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DU CASÉINO-GLYCOPEPTIDE ET DE LA CASÉINE KAPPA

Nous avons déterminé la composition en acides aminés de toutes les préparations de caséino-glycopeptide résultant de l'action de la présure sur cinq caséines : caséine de vache (entière, α et κ), caséine de brebis (entière) et caséine de chèvre (entière) ; ainsi que des fractions obtenues au cours de la chromatographie du caséino-glycopeptide sur des colonnes de résine. Nous avons également analysé la caséine κ , dont la composition en acides aminés n'avait pas encore été établie, et la paracaséine κ .

L'étude de la structure du caséino-glycopeptide a été commencée, à la fois pour la partie peptidique et pour la partie non peptidique. Nous avons cherché à déterminer les groupements N- et C-terminaux, la composition des fragments obtenus après hydrolyse trypsique, le mode de liaison du phosphore avec la partie peptidique, la position de l'acide sialique.

I. — Composition en acides aminés

A. — PRINCIPE

L'analyse qualitative a été faite par chromatographie sur papier, à une dimension, sur le produit de l'hydrolyse chlorhydrique totale des glycopeptides et de la caséine κ .

Toutes les analyses quantitatives, dont les résultats seront donnés dans la deuxième partie, ont été obtenues par chromatographie sur résine de l'hydrolysât chlorhydrique⁽¹⁾.

En 1951, MOORE et STEIN (99) ont décrit un procédé de séparation chromatographique de mélanges d'acides aminés par élution sur une résine synthétique : Dowex 50. Par rapport aux procédés anciens, celui-ci a permis de déterminer d'une manière plus précise et plus rapide la composition de mélanges complexes d'acides

⁽¹⁾ Dans le cas de la caséine κ , qui contient du tryptophane, la détermination de cet acide aminé a été faite séparément selon la technique de SPIES et CHAMBERS (100) ; avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde et le nitrite de soude (on sait que la tryptophane est détruit au cours de l'hydrolyse.)

aminés, tels que ceux qui se trouvent dans les hydrolysats de protéines. Le procédé original a été modifié par les auteurs afin d'effectuer toute l'analyse (acides aminés neutres, acides, ou basiques) à partir d'un seul hydrolysate et aussi afin d'obtenir une meilleure séparation des pics correspondant aux différents acides aminés, ainsi qu'un écoulement plus rapide.

B. — HYDROLYSE

Les acides aminés sont séparés par hydrolyse avec l'acide chlorhydrique 6 N, à 110°C, en tube scellé. La durée de l'hydrolyse est de 24 h pour l'analyse qualitative. Pour l'analyse quantitative nous avons fait deux hydrolyses, l'une de 18 h et l'autre de 48 h, de manière à apprécier la destruction éventuelle de certains composants au cours de l'hydrolyse.

Les quantités de substances, préalablement dessalifiées, correspondent à 0,05 μ mole pour la chromatographie sur papier et à 0,25 ou 0,5 μ mole pour la chromatographie sur colonne de résine. Nous avons admis que les poids moléculaires étaient ; 8 000 pour le caséino-glycopeptide et 26 000 pour la caséine α , d'après les indications approximatives fournies par des études antérieures (voir plus loin).

On emploie, pour l'hydrolyse, une quantité d'acide chlorhydrique 6 N égale à 500 fois la quantité de substance à analyser.

Après l'hydrolyse, on dilue par un volume d'eau et on amène à sec dans un dessiccateur sous vide, sur NaOH ; cette opération, destinée à éliminer HCl, est recommencée deux fois.

C. — ANALYSE QUALITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

L'hydrolysate sec est repris par très peu d'eau et chromatographié sur papier Whatman n° 1, dans le solvant E₁ (butanol-acide formique), parallèlement à une gamme témoin, contenant un mélange de 11 acides aminés, en quantités équimoléculaires (réactif o). La révélation est faite par la ninhydrine (réactif h) sur la gamme témoin. On rechromatographie, après élution à l'eau, les bandes provenant des niveaux où plusieurs composants peuvent se chevaucher : acides aminés basiques ; acide aspartique pouvant être souillé par la sérine ou le glycocolle ; acide glutamique, par la thréonine ; leucine, par l'isoleucine. Le reste du chromatogramme de la substance analysée est révélée directement (présence éventuelle d'alanine, tyrosine, valine et phénylalanine).

L'éluate au niveau des acides aminés basiques est rechromatographié dans le phénol (solvant F) tamponné à pH 4 ; les éluats au niveau des diacides, dans le phénol tamponné à pH 10 ; enfin l'éluate au niveau de la leucine est rechromatographié dans le *n*-butanol tamponné à pH 4.

D. — ANALYSE QUANTITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE RÉSINE

a) Résine

Nous avons utilisé l'Amberlite G. C. 120, selon MOORE et coll. (101). C'est une résine sulfonique (comme Dowex 50), composée de polystyrène, avec un « cross-linkage » de 8 p. 100. Elle se présente sous forme d'une poudre très fine. L'analyse

complète exige deux colonnes : une grande colonne de $150 \times 0,9$ cm pour la séparation des acides aminés neutres et acides ; une petite colonne de $15 \times 0,9$ cm pour la séparation des acides aminés basiques.

b) *Chromatographie sur la colonne de $150 \times 0,9$ cm*

La résine est régénérée dans NaOH 0,2 N, puis dans une solution tampon à pH 4,25 0,2 M (n° 13). Lorsque le pH du surnageant est 4,25, la résine atteint le gonflement maximum ; elle est introduite par portions dans la colonne. Après tassement on passe NaOH 0,2 M contenant 0,5 p. 100 d'une solution de « Brij-35 » (Chap. V) et on tamponne la colonne à pH 3,25 0,2 M (solution n° 14).

L'hydrolysât d'une quantité de glycopeptide correspondant à 0,25 ou 0,5 μ mole est repris par 1 ml de solution tampon pH 3,25 0,2 M. On élimine les matières humiques, résultant de la décomposition des sucres, par centrifugation. Le surnageant est porté sur la colonne ; ainsi que le deuxième surnageant obtenu en traitant le culot par 1 ml de la même solution tampon.

La chromatographie se fait à 50°C ; elle commence avec le tampon 3,25 0,2 M (n° 14) et se poursuit avec le tampon 4,25 0,2 M (n° 13) lorsque l'alanine est sortie de la colonne. On recueille des fractions de 1 ml sur un collecteur automatique. Une fraction sur deux est dosée par la méthode à la ninhydrine, décrite au chapitre précédent (sans hydrolyse alcaline préalable). Les lectures des densités optiques à 570 m μ sont converties en équivalents de leucine. Les quantités des différents acides aminés sont exprimés en micromolécules, par l'utilisation des coefficients déterminés une fois pour toutes (95), étant donné que tous les acides aminés ne donnent pas la même coloration, dans les mêmes conditions. On a également exprimé la composition en acides aminés en p. 100 de la partie peptidique.

Dans le cas de la sérine et de la thréonine, on a augmenté la valeur trouvée de 5 p. 100, pour tenir compte de la destruction de ces acides aminés.

c) *Séparation des acides aminés basiques*

La petite colonne, $15 \times 0,9$ cm, est remplie avec la résine suspendue dans la solution tampon à pH 5,28 0,35 M (n° 15). On charge la colonne avec une quantité de produit hydrolysé deux fois moindre que dans la séparation précédente. L'élution est faite à 50°C avec une seule solution tampon de pH 5,28 (n° 15) ; on obtient ainsi une base constante tout au long du chromatogramme.

La localisation des substances et le calcul des proportions des acides aminés basiques et de l'ammoniaque sont faits comme dans le cas de la grande colonne.

d) *Nouvelle technique*

Une partie des déterminations de la composition en acides aminés a été faite avec l'analyseur automatique « Technicon », qui permet une meilleure séparation des composants, d'où une plus grande précision, dans un temps plus court. Avec l'hydrolysât de 1 mg de glycopeptide (0,12 μ mole) nous avons obtenue de bons résultats. Nous avons appliqué la technique d'élution de PIEZ et MORRIS (102).

II. — Détermination des acides aminés N-terminaux

A. — PRINCIPES

Nous avons utilisé successivement deux méthodes :

1) La méthode de SANGER (103) consiste à condenser l'acide aminé terminal, par le NH_2 libre, avec le dinitrofluorobenzène en milieu alcalin. Il se forme une liaison stable ; l'hydrolyse acide détache les dérivés dinitrophénylés des résidus N-terminaux ; ces DNP- dérivés sont identifiés par chromatographie sur papier.

Cette méthode a l'avantage de donner naissance à des dérivés qui sont d'une manipulation aisée en raison de leur coloration jaune vif. Mais il se forme en même temps des dérivés parasites : DN-phénol, DN-aniline, etc.

2) La méthode d'EDMAN (104) consiste à former le dérivé phénylthiocarbamyl du peptide, par réaction avec le phénylisothiocyanate. Après cyclisation le phénylthiohydantoïne-acide aminé se détache ; par hydrolyse on régénère l'acide aminé ; ce dernier est caractérisé par chromatographie sur papier.

Cette méthode s'est avérée inapplicable au caséino-glycopeptide, du fait de la présence des sucres dans la molécule.

B. — TECHNIQUE (selon SANGER)

On dissout dans 0,1 ml d'eau 0,5 μ mole de glycopeptide ; on ajoute 0,1 ml d'une solution de dinitrofluorobenzène à 2 p. 100 dans l'acétone. Le pH est ajusté à 8,0 par une solution diluée de triméthylamine. On agite pendant 2 h à température ambiante. L'excès du réactif est extrait par l'éther ; ensuite on évapore à sec sous vide pour éliminer la triméthylamine, en présence de SO_4H_2 .

Les dérivés dinitrophénylés (DNP) des acides aminés sont hydrolysés par HCl 6 N, 8 h à 110°C en tube scellé. On dilue l'hydrolysât par deux volumes d'eau pour un volume de HCl et l'on fait plusieurs extractions par l'éther.

Les DNP -acides aminés sont recherchés dans les deux phases. La phase acide contient en outre les acides aminés libres.

La séparation des dérivés DNP a été faite par chromatographie sur papier Schleicher et Schüll n° 507 avec le solvant G (phénol, alcool isoamylique, eau), pour les DNP -acides aminés éthérosolubles, et sur papier Whatman n° 1 avec le solvant E_1 (butanol, acide formique, eau), pour les DNP-acides aminés acidosolubles.

III. — Détermination des acides aminés C-terminaux

A. — PRINCIPE

Par action de la carboxypeptidase, l'acide aminé C-terminal est libéré. Son identification est faite par chromatographie sur papier. L'acide aminé doit avoir son groupe carboxylique libre et appartenir à la série L. Les méthodes chimiques sont plus délicates d'application que la méthode enzymatique.

Cette méthode a été appliquée dans les conditions décrites par JOLLES-THAUREAUX et coll. (98).

B. — TECHNIQUE

Environ $0,1 \mu$ mole de glycopeptide sont dissous dans 0,9 ml d'eau. On ajoute 0,1 ml d'une solution 2×10^{-3} M de diisopropylfluorophosphate. Cette substance inhibe les endopeptidases qui peuvent accompagner la carboxypeptidase (105). Le pH est ajusté à 7,8 (pH optimum de l'enzyme) par la triméthylamine. On ajoute 0,05 ml d'une solution de carboxypeptidase recristallisée (Worthington) à 2 mg/ml. La réaction est accomplie à 37°C ; elle est arrêtée après 3 heures, par acidification avec l'acide acétique normal.

L'identification de l'acide aminé est faite par chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le solvant E_1 (butanol, acide formique, eau).

IV. — Étude de l'hydrolysate tryptique

A. — PRINCIPE

Lorsque sont connus les acides aminés terminaux, l'étape suivante, dans l'étude de la structure chimique des substances contenant un grand nombre de résidus d'acides aminés, est le découpage de la molécule en fragments plus simples, par hydrolyse enzymatique ou par hydrolyse chimique. Ces fragments polypeptidiques sont séparés, purifiés et leur composition est ensuite étudiée.

L'hydrolyse acide partielle ne convient pas lorsque l'on est en présence de grosses molécules, en raison de la complexité du mélange de peptides qui en résulte et de la difficulté de remonter à l'enchaînement de la molécule originelle. Par contre, l'utilisation des enzymes grâce à leurs spécificités, permet de résoudre le problème.

La trypsine est l'enzyme protéolytique possédant la plus grande spécificité ; elle coupe les liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques de la lysine et de l'arginine. L'absence d'arginine dans nos caséino-glycopeptides n'a permis d'obtenir qu'un nombre limité de peptides après action de la trypsine (« unités tryptiques »). Nous en sommes actuellement là. La poursuite de cette partie de notre travail, actuellement en cours, exige l'emploi d'autres enzymes, notamment de la chymotrypsine, qui est douée d'une spécificité différente de celle de la trypsine ; ces expériences permettront plus tard de définir l'ordre de succession des « unités tryptiques ».

B. — TECHNIQUE

L'hydrolyse d'une solution aqueuse de peptide à 1 ou 2 p. 100 est faite à 37° et à pH 7,8 ; le rapport enzyme/substrat est 1/50. On emploie la trypsine Worthington recristallisée contenant 50 p. 100 de Mg SO_4 et ayant subi un traitement préalable par HCl en vue d'inactiver les traces de chymotrypsine (HCl N/16, 37°C pendant 18 h, avec une solution à 1 p. 100 de trypsine). L'hydrolyse est arrêtée après 1 h par acidification à pH 2,2.

Les peptides formés au cours de l'hydrolyse sont isolés par chromatographie sur colonne de Dowex 50-X2, en utilisant les techniques décrites au chapitre précédent pour l'élution, le repérage de la place des peptides et leur dessalification sur résines échangeurs d'ions.

Les peptides dessalinés sont amenés à sec et conservés à -15°C . Ils ont été analysés au point de vue de leur composition en acides aminés par la méthode décrite précédemment.

V. — Caractérisation de la phosphosérine

A. — PRINCIPE

Le mode de liaison du phosphore a été étudié par la méthode indiquée par WILLIAMS et SANGER (106). Ces auteurs ont montré que le phosphore dans la caséine entière est lié à la sérine, en soumettant à l'électrophorèse en milieu acide un hydrolysate acide partiel. Le pH est tel que les groupes carboxyliques libres ne sont pas chargés tandis que le groupe phosphorique l'est encore.

B. — TECHNIQUE

Le peptide est hydrolysé par HCl concentré à 37°C pendant 12 heures. L'hydrolysate est amené à sec.

L'électrophorèse est faite dans une solution tampon acide contenant 20 p. 100 d'acide formique, dont le pH est 1,5, sous 500 volts pendant 2 heures. La phosphosérine est révélée par le réactif à la ninhydrine (*h*).

VI. — Position de l'acide sialique

A. — PRINCIPE

La α -neuraminidase, enzyme extrait de *Vibrio cholerae* (« receptor destroying enzyme ») libère l'acide neuraminique lorsqu'il se trouve en position terminale (107).

B. — TECHNIQUE

1 mg de caséino-glycopeptide est dissous dans 1 ml de solution tampon d'acétate d'ammonium pH 6 0,03 M ; on fait agir pendant 1 ou 2 h à 37°C , 3 000 unités (2 μg) de α -neuraminidase (don du Dr ADA, Melbourne). Après l'hydrolyse on dose l'acide sialique libéré par la méthode de WARREN, décrite au chapitre IV.

Composition des réactifs.

(o) Mélange d'acides aminés (gamme témoin), pour l'étude du caséino-glycopeptide.

— Solution des acides aminés suivants à la concentration de 0,01 M, dans le solvant : HCl 2 M 3 ml, isopropanol 25 ml, eau 22 ml.

— 5 μ l contiennent 0,05 μ mole de chacun des acides aminés : Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Ileu, Leu, Lys, His.

Composition des solutions tampons.

n° 13 (pH 4,25 — 0,2 M) ; pour 1 litre : acide citrique H_2O 21 g, NaOH pur 8,25 g, HCl conc. 4,7 ml, Brij 35 (à 33 p. 100) 5 ml.

n° 14 (pH 3,25 — 0,2 M) ; pour 1 litre : acide citrique H_2O 21 g, NaOH pur 8,25 g, HCl conc. 11 ml, Brij 35 (à 33 p. 100) 5 ml.

n° 15 (pH 5,28 — 0,35 M) ; pour 1 litre : acide citrique H_2O 24,5 g, NaOH pur 14,4 g, HCl conc. 6,8 ml, Brij 35 (à 33 p. 100) 5 ml.

Composition des solvants pour la chromatographie.

G-phénol 100, alcool isoamylique 100, eau 100 (en volume).

DEUXIÈME PARTIE

RÉSULTATS

CHAPITRE VII

LE SUBSTRAT ET L'ENZYME

I. — Le substrat

L'étude des produits de la réaction enzymatique présente de l'intérêt surtout par la lumière qu'elle peut jeter sur la réaction elle-même. Sous cet angle, une telle étude sera d'autant plus profitable que le substrat de l'enzyme sera mieux connu dans sa composition et sa structure. Nous avons dit dans l'introduction que le véritable substrat de la présure paraît être la caséine κ , qui représente actuellement le plus haut degré de pureté atteint dans la séparation des constituants de la caséine isoélectrique sensibles à la présure. Nous avons donc fait une analyse assez complète de cette caséine : composition en acides aminés, composition de la partie glucidique et nous avons abordé l'étude de sa structure.

La caséine κ n'a été préparée, jusqu'ici, qu'à partir de la caséine du lait de vache. Nous avons essayé de préparer la caséine κ de brebis ; mais nous ne sommes pas encore parvenus à isoler une fraction pure.

Il faut souligner le fait que la réaction de la présure se produit avec la caséine entière, la caséine α préparée par la méthode à l'urée (23) ou la caséine κ obtenue à partir du lait de vache ; ces trois substrats donnent également lieu à la formation du caséino-glycopeptide, mais en proportions différentes. On peut penser qu'il en va de même pour les caséines du lait d'autres espèces animales, qui coagulent comme le lait de vache sous l'action de la présure.

On doit remarquer, d'autre part, que la composition chimique de la caséine entière de vache et celle de la caséine α sont assez constantes. Récemment HIPP et coll. (108) ont montré que la composition en acides aminés de la caséine α , obtenue par différentes méthodes, variait très peu d'une préparation à l'autre. Il est permis de penser que les proportions de chacune des fractions composant ces caséines doivent être toujours approximativement les mêmes, du moins dans les caséines obtenues à partir du lait de mélange de plusieurs animaux.

Les caséines de chèvre et de brebis sont mal connues ; nous donnerons dans ce chapitre les résultats de nos analyses. Nous donnerons également des résultats concernant la *caséine humaine*, car les données sont rares dans la littérature. Cette caséine se place en marge de notre travail ; elle présente un intérêt théorique du fait qu'elle paraît se comporter différemment des caséines animales que nous avons étudiées, vis-à-vis de la présure (1). Nous l'avons préparée comme la caséine entière de vache, avec lavage à l'alcool et à l'éther.

(1) Nous remercions M^{me} BERTRAND et l'École de Puériculture de Paris pour la fourniture de lait humain

II. — Composition électrophorétique des caséines

Nous avons fait quelques examens par électrophorèse sur papier ; la séparation des constituants de la caséine entière est difficile à obtenir par cette méthode, avec les solvants ordinaires : véronal sodique à pH 8,6 ou phosphate à pH 6,8. Une tension faible (75 volts) et une longue durée de migration (15 h) favorisent la séparation des fractions α et β . (Cette méthode a été récemment améliorée par l'introduction d'urée dans les solutions tampon (109 (110).)

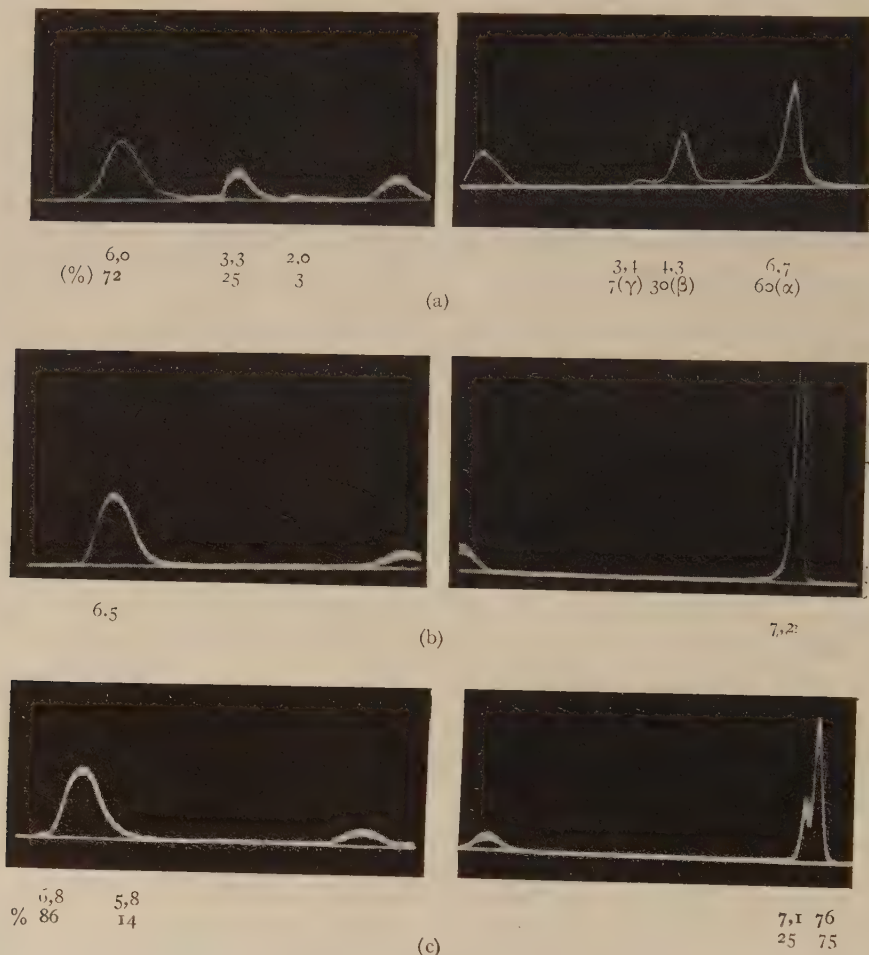


FIG. 8. — Diagrammes d'électrophorèse des caséines de vache

- pH 8,6 (véronal-véronal Na) ; force ionique 0,1 ;
- 8,3 volts/cm ;
- mobilités et surfaces calculées à 9 500 secondes ;
- à gauche : branche descendante ;
- à droite : branche ascendante ;
- (a) caséine entière, 1,15 p. 100 ;
- (b) caséine α , n° 1, 1,3 p. 100 ;
- (c) caséine α , n° 2, 0,9 p. 100 ;
- (Appareil Fokal-Strubin).

Toutes les caséines sur lesquelles nous avons fait réagir la présure cristallisée ont été examinées comparativement par électrophorèse en phase liquide selon TISELIUS ; on a pu ainsi déterminer, avec une meilleure précision que sur le papier, la mobilité des constituants et leur proportion. Les figures 8, 9 et 10 présentent quelques-uns des diagrammes d'électrophorèse que nous avons obtenus. On observe souvent avec la caséine des anomalies : pics dissymétriques, pics étalés dans la branche descendante, mobilités très différentes dans chacune des deux branches. Ces anomalies révèlent des interactions entre les composants électrophorétiques. Dans le cas de la caséine entière de vache, elles ont été signalées par plusieurs chercheurs (22) (111) ; les surfaces relatives des pics, correspondant aux constituants α et β , varient légèrement avec la concentration en caséine.

Le diagramme électrophorétique à pH 8,6 de la caséine entière de vache, à la concentration de 1,15 p. 100 est représenté sur la figure 8 (a) ; on distingue les trois constituants, dont les mobilités calculées sur la branche descendante sont : α 6,0 — β 3,3 et γ 2,0. Le rapport des aires α/β est égale à 3,0. Il est à noter que le constituant mobile γ disparaît lorsque la caséine a été lavée à l'alcool et à l'éther.

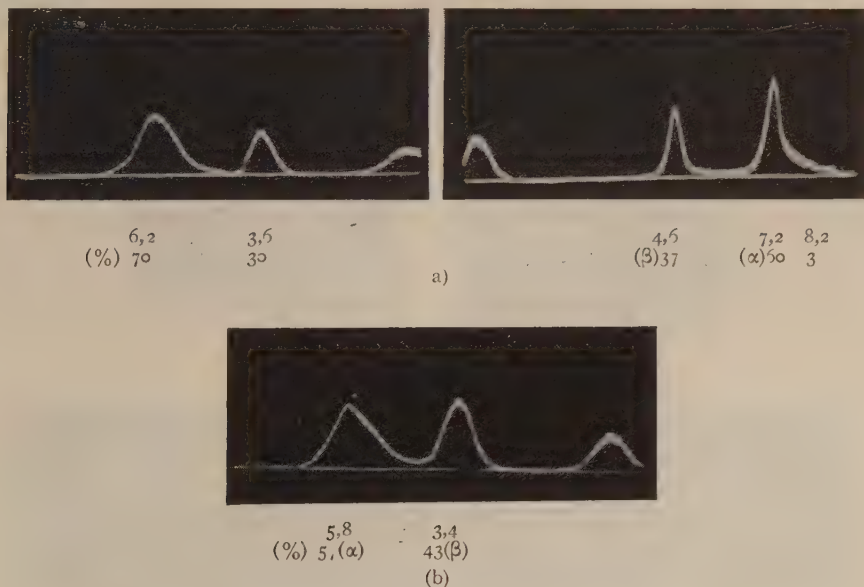


FIG. 9. — Diagrammes d'électrophorèse des caséines de brebis et de chèvre

(Mêmes conditions que dans les examens de la figure 8)

(a) Caséine de brebis ; 1,2 p. 100.

(b) Caséine de chèvre ; 1,3 p. 100 (branche ascendante peu visible).

Dans les caséines entières de brebis et de chèvre, examinées dans les mêmes conditions que ci-dessus (figure 9) le rapport α/β est plus bas, respectivement 2,3 et 1,3 ; la proportion du constituant α est donc plus faible que dans la caséine de vache. Dans le cas de la caséine de chèvre, cette différence a déjà été rapportée (112).

Dans une première préparation de caséine α , un seul constituant apparaît à pH 8,6, formant un pic dissymétrique dans la branche ascendante : figure 8-b. Dans une deuxième préparation, une division du pic s'est produite dans la branche

ascendante seulement, à pH 8,6 : figure 8-c ; mais en milieu acide (tampon glyco-colle/HCl, pH 3), la division du pic α s'est produite dans les deux branches ; (les mobilités déduites de cet examen, non représenté dans la figure 8, sont : 11,5 et 9,9 dans la branche ascendante et 10,0 et 8,2 dans la branche descendante). WARNER (22) a constaté la division du pic α lorsque la concentration en caséine est inférieure à 0,6 p. 100. Dans les expériences précédentes la concentration était de 1,3 p. 100 (première préparation) et 0,9 p. 100 (deuxième préparation).

On remarque que la caséine κ n'apparaît pas dans les diagrammes électrophorétiques de la caséine α et des caséines entières. Elle migre avec le composant α_s dans le pic α . La séparation des constituants de la caséine α a été récemment obtenue en solution concentrée d'urée (113 et 114).

III. — Critères de pureté et propriétés particulières de la caséine κ

a) La figure 10 montre que la caséine κ que nous avons préparée se comporte comme une substance homogène à l'électrophorèse, aussi bien à pH 8,6 qu'à pH 2,35.

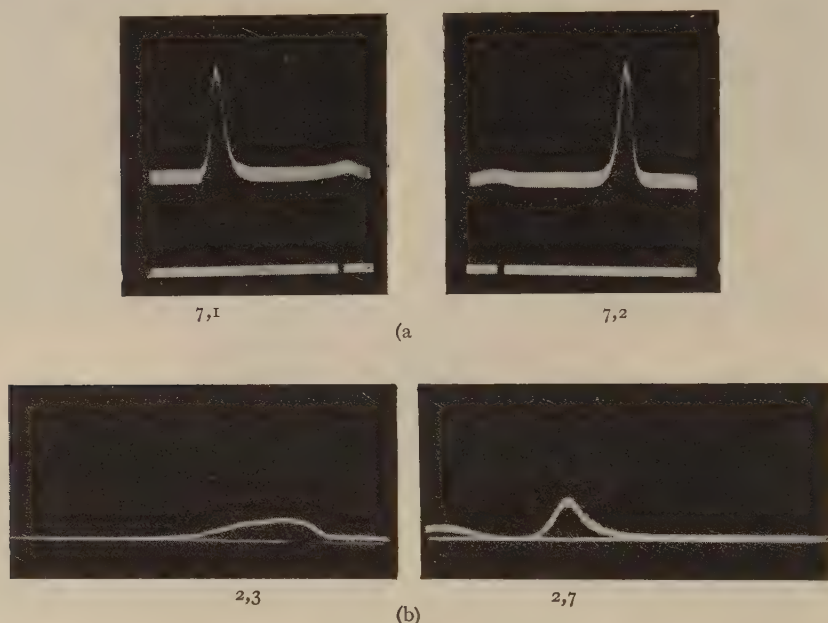


FIG. 10. — Diagrammes d'électrophorèse de la caséine κ de vache (1 p. 100)
 (a) à pH 8,6 (véronal-véronal Na) ; force ionique 0,1 ;
 — 10,3 volts/cm ; 3 600 secondes,
 (Appareil Perkin-Elmer).
 (b) à pH 2,35 (HCl/NaCl) ; 3,9 volts/cm ; 18 000 secondes
 (Appareil Fokal-Strubin).

Selon MCKENZIE et WAKE (115) la caséine κ montre un pic unique dans le diagramme de sédimentation, aussi bien à pH 6,5 et 40°C ($S_{20} = 13,9$), qu'à pH 8,6 et 20°C, en solution d'urée 7 M ($S_{20} = 1,15$). Le poids moléculaire a été estimé à $26\,000 \pm 3\,000$ (115).

Dans l'électrophorèse en gel d'amidon la caséine κ donne une bande étirée ; dans l'électrophorèse en gélose une seule bande rapide a été observée (113).

Dans la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose en milieu urée, la caséine κ donne un seul pic au cours du gradient d'élution, d'après RIBADEAU DUMAS (114). Cependant l'auteur fait des réserves sur l'homogénéité de la substance. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

b) La caséine κ , que nous avons préparée, est soluble dans l'eau en présence d'une quantité infime de sel, 0,005 M NaCl, sans addition de soude. La solubilité des préparations lyophilisées décroît avec le temps de conservation.

La propriété la plus caractéristique de la caséine κ est, rappelons-le, la formation d'un coagulum sous l'action de la présure, en l'absence de calcium (36). Ce coagulum translucide et formant des fibrilles après agitation est bien différent du gel formé par la caséine entière ou la caséine α , en présence de calcium. Cette propriété permet d'apprécier rapidement la réussite d'une préparation de caséine κ . Les autres constituants de la caséine entière ne la possèdent pas ; au contraire, ils inhibent la formation du précipité par la caséine κ , lorsque la préparation est insuffisamment purifiée.

Du fait de sa teneur en glucides plus élevée que celle des caséines entière et α de vache, la caséine κ a une teneur en azote (13,5 p. 100) plus faible que les précédentes.

Observations sur la caséine κ de brebis. En appliquant à la caséine entière de brebis, la méthode de fractionnement de MCKENZIE et WAKE (51), établie pour la caséine de vache, nous n'avons pas pu isoler une fraction électrophorétiquement pure. Mais nous avons obtenu une substance purifiée qui possède les propriétés caractéristiques de la caséine κ de vache ; elle flocule après addition de la présure, en l'absence de calcium, et elle donne une proportion élevée d'azote non protéique (chap. VIII).

IV. — Composition en acides aminés de la caséine κ

Nous avons établi la composition de la caséine κ par la méthode de MOORE, SPACKMANN et STEIN (101) décrite au chapitre VI (en collaboration avec P. JOLLÈS, 116). Le tableau I donne la composition en g pour 100 g de caséine sèche et en nombre de résidus pour un poids moléculaire de 26 000 (d'après la détermination approchée de MCKENZIE et WAKE, 115). Ces valeurs sont la moyenne de 3 analyses faites sur 3 préparations différentes. Nous avons mis en parallèle la composition moyenne de la caséine α , qui renferme la caséine κ , d'après HIPPEL et coll. (108).

La caséine κ contient tous les acides aminés de la caséine α et de la caséine entière ; mais il y a des différences notables entre κ et α ; elles concernent surtout Ala, Cys et Thr (plus abondants dans κ) et Gly, Met, His, Try et Lys (plus abondants dans α).

La cystine présente dans la caséine κ est facilement oxydée durant l'analyse (sans l'action de l'acide performique) ; une partie est titrée sous forme d'acide cystéique. Une détermination des acides aminés après oxydation performique a donné les mêmes résultats que la détermination directe.

TABLEAU I
Composition en acides aminés de la caséine α (116)

Acides aminés	Caséine		Caséine α ⁽²⁾ g/100 g protéine
	résidus ⁽¹⁾	g/100 g protéine	
Asp	17	7,30	8,05
Thr	17	6,64	4,20
Ser	18	6,09	6,40
Glu.....	36	17,35	21,00
Pro.....	23	8,78	8,24
Gly.....	5	1,31	2,01
Ala.....	18	5,41	3,48
Cys.....	1	1,40	0,44
Val	13	5,10	5,70
Met	2	1,00	2,67
Ileu	14	6,14	5,75
Leu	14	6,08	7,98
Tyr	13	7,40	7,30
Phé	8	4,07	4,66
Lys	12	5,76	9,31
His	3	1,67	2,92
Arg	7	4,00	3,92
Try	1 à 2	1,05	2,00
NH ₃	17		

Résidus, g p. 100 de protéine :

80,62

⁽¹⁾ Calculés pour PM = 26 000.

⁽²⁾ Valeurs moyennes selon HIPP et coll. (108).

Dans la caséine α , comme dans la caséine entière et la caséine α , il y a un net excès des groupes carboxyliques libres ; à ceux-ci s'ajoutent les groupes acide phosphorique et l'acide sialique (voir plus loin), pour donner à la caséine α un caractère acide marqué.

V. — Acides aminés terminaux de la caséine α

a) Nous n'avons pu caractériser aucun acide aminé N-terminal par la méthode de SANGER ; les seuls dérivés obtenus en quantité appréciable sont : ϵ — DNP — Ly-sine et O — DNP — tyrosine (116).

L'extrémité aminée de la chaîne peptidique de la caséine α est engagée dans une liaison qui reste à déterminer. Il est possible qu'un des composants de la partie non peptidique (sucre, sucre aminé, acide sialique), soit impliqué dans cette liaison.

b) Par action de la carboxypeptidase nous avons pu caractériser la valine, la thréonine, l'alanine et la sérine comme faisant partie de la séquence C-terminale. On ne peut encore décider s'il y a plusieurs chaînes ou une seule. Les proportions de ces acides aminés sont données dans le tableau 23 au chapitre XII, par comparaison avec ceux de la paracaséine α , formés d'après l'action de la présure sur la caséine α .

VI. — Composition de la partie non peptidique des caséines

Le tableau 2 résume les résultats que nous avons obtenus par les méthodes analytiques décrites au chapitre IV.

TABLEAU 2

Composition de la partie non peptidique des caséines (p. 100 de la substance sèche)

Caséine	Sucre réduct.	Osamine	Acide sialique ⁽²⁾	Glucides totaux	P	Total non peptidique ⁽³⁾
<i>Caséine entière : ..</i>						
de vache ⁽¹⁾ ...	0,38	0,35	0,36	1,10	0,83	3,27
de brebis ⁽¹⁾	0,33	0,24	0,09	0,66	0,86	2,91
de chèvre ⁽¹⁾ ...	0,39	0,31	0,13	0,82	0,77	2,83
humaine :	2,53	2,21	0,80	5,54	0,45	6,72
<i>Fractions de la caséine de vache</i>						
caséine α	0,40	0,36	0,38	1,14	0,94	3,60
caséine β	0,06	0,11	0,09	0,26	0,58	1,78
<i>Caséine entière privée de la fraction α ..</i>	0,13	0,10	0,07	0,30	0,96	2,81
<i>Caséine α</i>						
n° 1 ⁽¹⁾	1,40	1,22	2,40	5,02	0,22	5,60
n° 2	1,59	1,52	2,13	5,24	0,214	5,80
n° 3	1,31	1,73	2,09	5,13	0,217	5,70
n° 4	1,29	1,38	2,31	4,98	0,20	5,50

⁽¹⁾ — référence (77)

⁽²⁾ — en acide N-acétylneuraminique (PM 309) ;

⁽³⁾ — glucides totaux + PO_3H_2^- .

Toutes les caséines contiennent une partie non peptidique représentant de 3 à 7 p. 100 de la substance sèche et renfermant du phosphore et des glucides : sucre réducteur, sucre aminé et acide sialique.

On remarque que la caséine α contient environ 4 fois moins de phosphore que la caséine entière. Les caséines de brebis et de chèvre ont à peu près la même teneur en phosphore que la caséine de vache ; la caséine humaine en contient environ 2 fois moins.

Il y a de fortes différences, dans la composition glucidique, entre les 4 caséines entières analysées. La caséine humaine contient environ 6 fois plus de glucides que celle des animaux.

La caséine α de vache est beaucoup plus riche en glucides que les autres constituants. La préparation de caséine entière privée de α n'en contient que 0,3 p. 100 ; il est d'ailleurs possible qu'elle renferme encore de la caséine α .

Nous avons mentionné, dans le tableau 2, les résultats de l'analyse de 4 préparations différentes de caséine κ , étant donné leur nouveauté. On constate des écarts, mais ils sont peu importants dans l'ensemble.

D'après les valeurs obtenues pour la caséine entière de vache, la caséine κ et la caséine entière privée de κ , il est possible de calculer approximativement la quantité de caséine κ contenue dans la caséine entière (quantité qu'on ne peut actuellement déterminer directement avec précision). Nous obtenons en prenant pour base, *a*) le phosphore : 17,6 p. 100 ; *b*) l'acide sialique : 13,6 p. 100 ; *c*) les sucres réducteurs : 19,3 p. 100 et *d*) les sucres aminés : 18 p. 100. Si l'on excepte le calcul basé sur la teneur en acide sialique (le dosage est difficile dans la caséine résiduelle) ; les autres montrent que la caséine entière contiendrait environ 18 p. 100 de caséine κ . WAUGH (36) a calculé, d'après les diagrammes d'électrophorèse, que la caséine entière contient environ 15 p. 100 de caséine κ .

Bilan analytique de la caséine κ .

La caséine κ contient en moyenne 5,7 p. 100 de glucides et d'acide phosphorique. Les résidus d'acides aminés représentent 80,6 p. 100 de la substance sèche. Il y a donc une partie qui a échappé à l'analyse : 13,7 p. 100. Nous reviendrons sur ce déficit dans la discussion.

VII. — Identification des glucides

Par les méthodes chromatographiques décrites au chapitre IV, nous avons identifié dans les caséines provenant du lait de vache un sucre réducteur : le galactose, une osamine : la galactosamine, et un acide sialique : l'acide N-acétylneuraminique. Dans les caséines de brebis et de chèvre nous avons également identifié le galactose et la galactosamine. L'identification de l'acide sialique n'a pas été effectuée dans ces deux dernières caséines ; elle est difficile étant donnée la faible quantité qu'elles contiennent. Nous verrons plus loin que les caséino-glycopeptides issus de ces deux caséines contiennent un deuxième acide sialique, l'acide N-glycolylneuraminique ; ces deux acides existent donc dans la caséine correspondante ; (les chromatogrammes d'identification sont présentés au chapitre XI). Dans la caséine humaine nous n'avons trouvé que l'acide N-acétylneuraminique.

VIII. — Composition en acides aminés de la caséine humaine

Il n'a pas encore été établi que la caséine humaine renferme un constituant correspondant à la caséine κ (nous verrons plus loin que sa présence est discutée.)

Les analyses complètes de la caséine humaine sont rares. Nous n'en connaissons aucune qui ait été effectuée par les méthodes chromatographiques modernes. C'est pourquoi nous avons déterminé la composition en acides aminés de la caséine humaine, qui a été utilisée dans nos expériences concernant l'action de la présure (117). Nous avons suivi la même méthode que celle qui a servi à déterminer la composition de la caséine κ , de la paracaséine κ et des caséino-glycopeptides.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3. Ils se rapportent à une préparation de caséine obtenue par précipitation à pH 4,6 d'un lait de mélange de lactarium, (la caséine est lavée à l'eau, à l'alcool et à l'éther). La partie peptidique représente 80 p. 100 de la substance sèche. Nous avons vu plus haut que la partie non peptidique (glucides + acide phosphorique) représente 6,7 p. 100. Il y a donc un indosé voisin de 13 p. 100 (nous avons observé un indosé en même importance avec la caséine κ).

Les différences les plus marquantes entre la caséine humaine et la caséine de vache portent sur la cystine qui est environ trois fois plus abondante dans la caséine

TABLEAU 3

Composition en acides aminés de la caséine humaine (117)

Acides aminés	p. 100 de substance sèche
Asp	7,5
Thr	4,35
Ser	4,3
Glu	18,3
Pro	10,9
Gly	1,78
Ala	2,83
(Cys-)	0,95
Val	4,85
Met	0,71
Ileu	4,4
Leu	10,8
Tyr	5,1
Phe	3,8
Lys	3,85
His	2,16
Arg	2,05
Try	2,4

humaine, et sur les acides aminés basiques qui sont sensiblement moins abondants dans cette dernière que dans la caséine de vache (la caséine de vache contient environ deux fois plus de lysine et d'arginine que la caséine humaine).

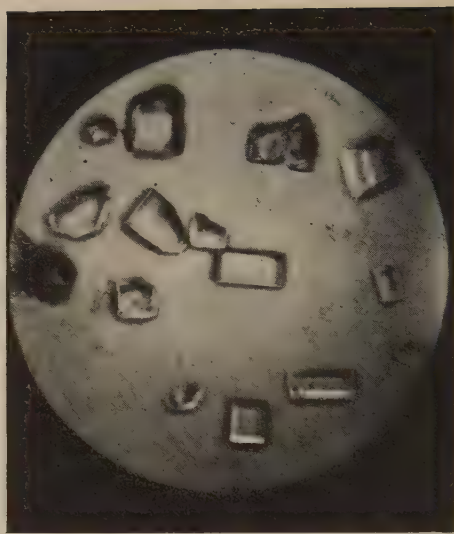
IX. — La présure cristallisée

La présure que nous avons purifiée par électrophorèse sur gélose et celle que nous avons obtenue en appliquant la méthode de BERRIDGE et WOODWARD (54) se trouvent sous la même forme cristallisée : cristaux microscopiques en plaques rectangulaires, comme le montre la figure 11.

La purification a permis d'éliminer tout d'abord la pepsine, qui n'est pas précipitée par NaCl à saturation. Une autre impureté est plus difficile à éliminer ; elle est révélée par l'électrophorèse en milieu liquide, sous forme d'un pic très étalé migrant derrière le pic correspondant à la présure pure (figure 12). Cette fraction a une activité coagulante très faible ; elle ne se colore pas par le réactif de SCHIFF ; ce n'est probablement pas une mucoprotéine provenant de la caillette.

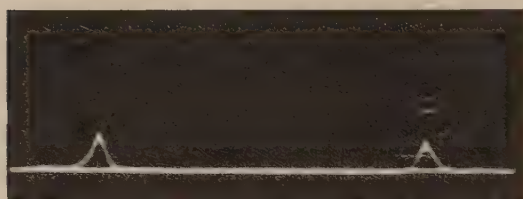


a) éclairage superficiel :

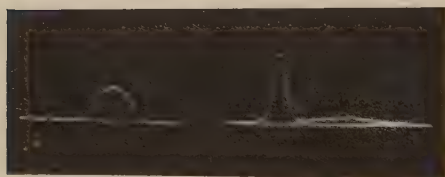


b) contraste de phase.

FIG. 11. — Cristaux de présure
Microphotographie ($\times 450$)



(a)



(b)

FIG. 12. — Diagrammes d'électrophorèse de la présure
pH 6,0 (phosphate 0,1 M);
4,75 volts/cm; 10 000 seconds;
a) présure cristallisée;
b) présure purifiée.

La purification s'accompagne d'une augmentation progressive de l'activité coagulante rapportée à la teneur en azote ; le rapport UP/mg N donne une indication de la pureté d'une préparation, comme le montre le tableau 4.

TABLEAU 4

Activité coagulante et teneur en azote des préparations de présure ()*

	UP/mg N (pureté)	N %	UP/g de préparation	« Force (**) »
Extrait du laboratoire	30	0,17	50	11 000
1 ^{re} précipitation par NaCl	140	0,35	500	110 000
2 ^e précipitation par NaCl	290			
3 ^e précipitation par NaCl	330			
Présure cristallisée	500	15,0	75 000	15 000 000

(*) — UP : unité présure (chapitre II) ;

(**) — Expression usuelle de l'activité coagulante (chapitre II).

Notre préparation de présure cristallisée donne un seul pic dans l'électrophorèse selon TISELIUS à pH 6,0 (figure 12).

La concentration de la présure ajoutée aux solutions de caséine est très faible, lorsqu'on se place dans les conditions usuelles de la coagulation du lait : de 0,01 à 0,03 UP/ml, soit de 0,14 à 0,4 μ g de présure/ml ; le rapport : présure/caséine est alors compris entre 1/70 000 et 1/200 000. Nous avons en général employé de telles quantités dans nos expériences. On voit qu'elles sont très inférieures à celles que l'on utilise dans le cas d'autres enzymes protéolytiques et que certains auteurs ont également utilisées dans le cas de la présure.

Il faut noter que l'activité coagulante des solutions aqueuses de présure diminue assez rapidement au cours de la conservation. La chute de l'activité s'accompagne d'une baisse de solubilité ; dans les solutions assez concentrées (plus de 200 μ g/ml), il se forme un dépôt ressemblant à du tapioca. Les congélations et décongélations fréquentes accélèrent cette dénaturation. La conservation des solutions est améliorée en milieu phosphate 0,1 M à pH 6,0, avec un peu de thymol, et conservation au congélateur.

N. B. Certains auteurs expriment la quantité d'enzyme en μ g d'azote de la présure. Nous avons établi la correspondance suivante, avec notre méthode de mesure :

UP	μ g N	μ g présure cristallisée
1	2	13,5
0,075	0,15	1,0
0,5	1	6,7

CHAPITRE VIII

LA FORMATION DES SUBSTANCES AZOTÉES NON PROTÉIQUES SOUS L'ACTION DE LA PRÉSURE ⁽¹⁾

I. — Les produits de la réaction

D'après les travaux fondamentaux que nous avons résumés dans l'introduction (6), (8), (12), (24), la caséine native donne, après action de la présure deux sortes de produits :

1. — Un produit insoluble : il s'agit de la caséine modifiée que l'on appelle « paracaséine » ; elle est insoluble en présence de calcium (elle forme le coagulum) et au point isoélectrique de la caséine : pH 4,6 — 4,7.

2. — Des produits solubles, dans les conditions ci-dessus. On désigne globalement sous le terme « protéose de HAMMARSTEN » les substances apparues en faible proportion dans le lactosérum après la coagulation de la caséine, en présence de calcium.

La protéose ne renferme pas que les produits détachés de la caséine au cours de la réaction spécifique qui précède la coagulation ; mais aussi ceux qui résultent d'une réaction non spécifique se poursuivant après la coagulation (ces deux réactions seront définies au cours de ce chapitre). La première réaction n'est pas connue dans sa nature ; c'est elle qui fait l'objet de nos recherches. WAUGH (36) a émis l'hypothèse que le substrat de l'enzyme, dans cette réaction, serait la caséine κ .

Nous nous sommes surtout intéressés aux produits solubles qui ont été peu étudiés jusque là, et plus particulièrement au plus soluble dans les réactifs déprotéinisants : le *caséino-glycopeptide* que nous avons trouvé presque à l'état de pureté dans le surnageant de la précipitation du mélange réactionnel, par l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale.

Nous avons étudié plus sommairement les produits de la réaction solubles dans l'acide trichloracétique à 2 p. 100, les produits solubles à pH 4,6 et les produits solubles en présence de calcium. Ils renferment, à côté du caséino-glycopeptide, des constituants présents chacun en proportion minime.

(1) Signification des abréviations utilisées :

— NPN : azote non protéique ;

— TCA : acide trichloracétique.

En ce qui concerne le produit insoluble, la paracaséine, on est encore assez mal renseigné sur ce qui la différencie chimiquement de la caséine native. Nous avons abordé l'étude de la paracaséine κ .

Avant d'étudier les produits de la réaction, nous nous sommes préoccupés des conditions de leur formation et des rapports qu'ils ont avec l'activité enzymatique de la présure, considérée sous différents aspects. Dans ce chapitre nous précisons l'influence de quelques facteurs sur la réaction ; mais nous n'avons pas déterminé les vitesses, les problèmes de cinétique se trouvant hors du cadre de notre étude.

Les études préliminaires ont été accomplies en employant comme substrat le lait et la caséine entière. Nous verrons plus loin que la caséine κ donne des résultats comparables, mais avec des proportions différentes d'azote non protéique. Des essais comparatifs ont été faits avec les caséines entières de brebis et de chèvre et avec la caséine humaine ; ils seront présentés à la fin de ce chapitre.

II. — Les substances azotées solubles dans l'acide trichloracétique et la réaction primaire de la présure

Nous avons montré en 1953 (ALAIS et coll. (26)) que l'on peut mettre en évidence une réaction enzymatique particulière de la présure sur la caséine par le dosage de l'azote soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale (NPN — 12 p. 100) en suivant la technique décrite au chapitre III.

Cette réaction peut être suivie quantitativement en fonction du temps. Elle est traduite par une courbe d'allure caractéristique ; la vitesse est maxima au commencement ; elle va ensuite en diminuant et devient pratiquement nulle ; alors une valeur finale de la proportion d'azote non protéique est atteinte ; cette valeur correspond au passage en solution d'environ 1,5 p. 100 de l'azote de la caséine, dans le cas du lait ou dans le cas de solutions de caséine de vache, dont la concentration est du même ordre de grandeur que celle du lait. Si l'on ajoute une nouvelle quantité de présure au mélange réactionnel, il n'y a plus formation d'azote non-protéique. Nous reviendrons plus loin sur l'interprétation de cette courbe, en étudiant la caséine κ .

En présence de calcium et à une température favorable, la coagulation survient après une durée correspondant approximativement à l'achèvement de la réaction, alors que le NPN-12 p. 100 n'augmente plus, ou seulement très peu.

La figure 13 représente la courbe de formation d'azote non protéique dans du lait à pH 6,7 sous l'action de la présure. Le mélange réactionnel est maintenu à 20°C afin d'empêcher la coagulation du lait. Les traits horizontaux représentent le temps de coagulation d'un petit volume du mélange brusquement porté à 40°C, au moment de chaque prélèvement pour le dosage de l'azote non protéique. Ce temps de coagulation va en décroissant et devient pratiquement nul au début du palier formant la deuxième partie de la courbe.

La question se pose de savoir si la réaction ainsi mesurée est la « réaction primaire » ou stade enzymatique, défini par BERRIDGE (24) ; — au cours duquel la caséine est modifiée avec solubilisation d'une petite partie ; ce qui permet l'accomplissement

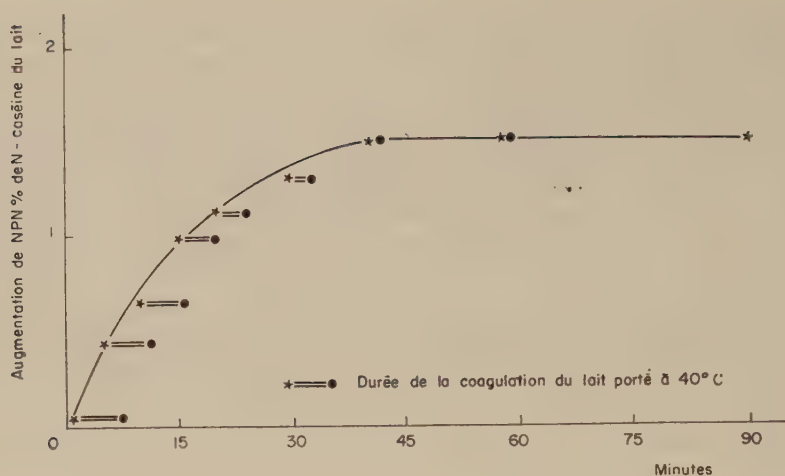


FIG. 13. — Formation de l'azote non protéique (NPN) dans le lait et raccourcissement du temps de coagulation par la présure
 $e : 0,04$ UP/ml ($0,5$ μ g de présure cristallisée) réaction à 20°C .
 TCA : $1,2\%$

de la coagulation proprement dite (« réaction secondaire » ou stade de coagulation) ; ou bien si cette réaction est distincte de la réaction primaire et se poursuit parallèlement à elle. Plusieurs faits sont en faveur de la première hypothèse :

1. — Le terme de la réaction, qui correspond approximativement au moment où la coagulation peut se produire, ainsi que le parallélisme entre la libération de l'azote non protéique et le raccourcissement du temps de coagulation dans l'expérience ci-dessus.
2. — Le fait que la coagulation n'ait jamais été observée avant l'accomplissement de cette réaction.
3. — La vitesse élevée de cette réaction à son début ; ce qui montre qu'elle a lieu avec la caséine native et non avec des produits d'une autre réaction. S'il s'agissait d'une réaction secondaire on devrait observer une période d'induction.
4. — L'existence d'une réaction analogue entre la thrombine et le fibrinogène (64) ; (cette réaction est considérée comme directement responsable de la coagulation du sang).

On a ainsi dissocié nettement deux stades dans l'action de la présure. Auparavant, la réaction de coagulation intervenait dans les études sur l'action de la présure. Les essais pour suivre par titrimétrie la réaction primaire seule, avaient été infructueux.

III. — Influence de la concentration de l'acide trichloracétique

Nous avons étudié l'influence de la concentration du réactif déprotéinisant sur la proportion d'azote non protéique, après une durée d'action de la présure correspondant au début du palier de la courbe $\text{NPN } f(t)$ à 12 p. 100 de TCA (26).

La figure 14 schématise les résultats obtenus avec une solution à 4 p. 100 de caséine entière de vache, à pH 6,8, après 45 minutes d'emprésurage à 25°C (0,3 UP soit 4 µg/ml). La déprotéinisation est faite en versant 1 volume de solution de caséine dans 4 volumes de solution de TCA.

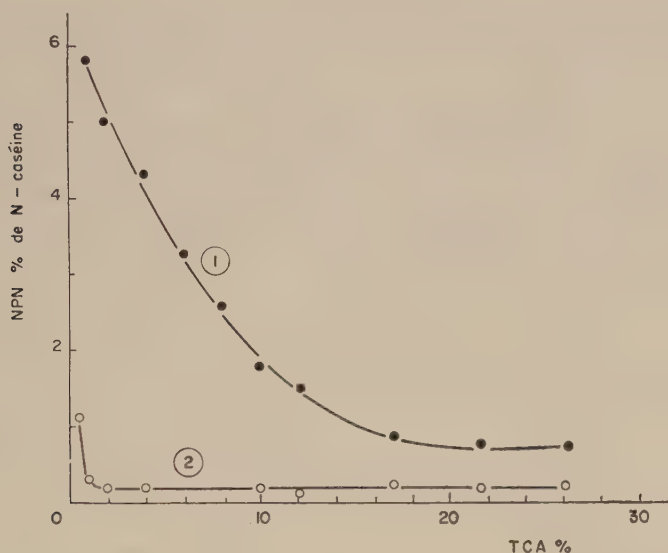


FIG. 14. — Influence de la concentration de l'acide trichloracétique (TCA) sur la proportion de NPN

e : 0,3 UP/ml (4 µg de présure cristallisée);
 s : 40 mg/ml (caséine entière);
 pH 6,8; 25°C;
 (1) après 45 minutes d'action de la présure;
 (2) sans présure (NPN-0).

On voit que la proportion d'azote non protéique décroît fortement lorsque la concentration de TCA dans le mélange croît de 1 à 18 p. 100; au-dessus de 18 p. 100 elle paraît demeurer fixe (courbe 1). A ces mêmes concentrations de TCA, une proportion faible et peu variable de la caséine (sans présure), passe en solution : de 0,15 à 0,25 p. 100; c'est la valeur de NPN au temps zéro (« NPN-0 »). En dessous de 1 p. 100 de TCA la solubilité de la caséine dans le réactif devient notable (courbe 2).

A 1 p. 100 de TCA, la quantité d'azote dans le filtrat trichloracétique (environ 0,4 mg) représente près de 6 p. 100 de l'azote de la caséine (N-caséine), alors qu'à 20 p. 100 de TCA il y en a environ 8 fois moins : 0,7 p. 100 (0,05 mg).

On peut déduire de la forme de la courbe 1 (figure 14) qu'il existe plusieurs substances solubles dans l'acide trichloracétique. Le choix de la concentration du réactif (un des plus utilisés dans l'étude des protéines) est donc arbitraire, comme l'est la désignation « azote non protéique ».

Dans la suite de notre travail nous avons choisi deux concentrations de TCA éloignées l'une de l'autre : 2 et 12 p. 100. Au-delà de 12 p. 100 de TCA, la quantité de substance se trouvant dans les filtrats devient faible, ce qui rend plus difficile

les dosages et les préparations. Il est à noter que 12 p. 100 de TCA est la concentration choisie par ROWLAND (69) dans ses études analytiques sur les protides du lait; à cette concentration il obtient une valeur minima d'azote non protéique.

IV. — Courbes d'azote non protéique en fonction du temps à 2 et à 12 p. 100 d'acide trichloracétique. Influence de la concentration de l'enzyme

Nous avons fait réagir la présure, à différentes concentrations, sur une solution à 4 p. 100 de caséine entière de vache à pH 6,8 et 25°C. La déprotéinisation est réalisée en ajoutant à un volume de mélange réactionnel, soit 4 volumes de TCA à 15 p. 100, soit 4 volumes de TCA à 2,5 p. 100; on obtient ainsi les concentrations finales de 12 et 2 p. 100, respectivement (26).

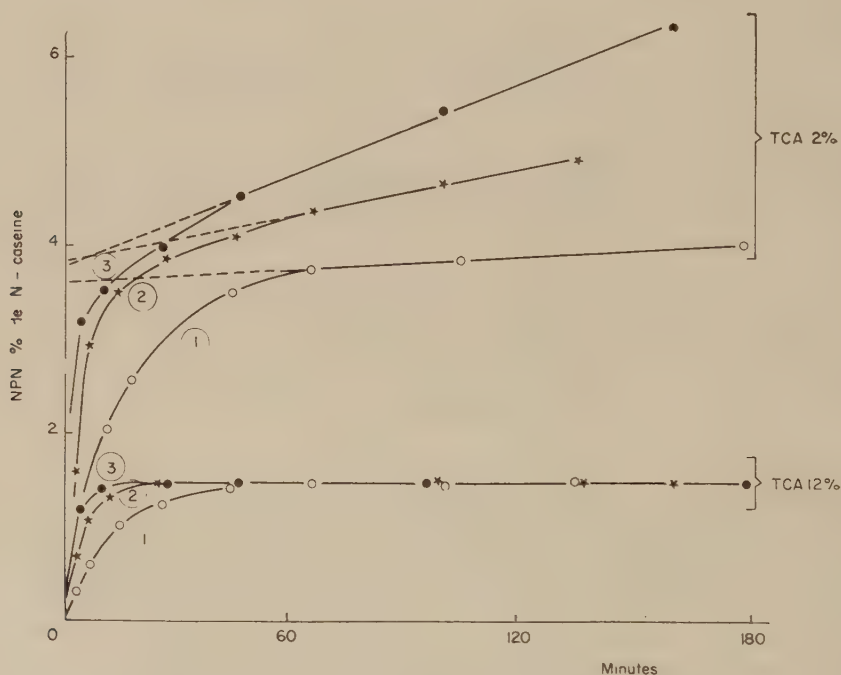


FIG. 15. — Courbes de NPN à différentes concentrations de la présure à 2 p. 100 et à 12 p. 100 d'acide trichloracétique.
e : (1) 0,4 μ g/ml (présure cristallisée);
 (2) 1,6 — — — — —
 (3) 4,0 — — — — —
s : 40 mg/ml (caséine entière);
 pH 6,8; 25°C.

Les courbes obtenues à 2 p. 100 de TCA présentent plusieurs différences avec celles obtenues à 12 p. 100, comme le montre la figure 15 :

— La première partie de la courbe a une forme comparable, mais elle se termine à une valeur d'azote non-protéique 2 à 3 fois plus élevée qu'à 12 p. 100 de TCA.

— La deuxième partie de la courbe n'est pas formée d'un palier (approximativement horizontal), comme à 12 p. 100 de TCA ; la quantité d'azote non protéique continue à s'accroître à une vitesse qui paraît constante, dans l'intervalle de temps considéré.

— La pente de la deuxième partie de la courbe à 2 p. 100 de TCA dépend de la concentration de la présure. Au contraire, à 12 p. 100 de TCA on obtient un seul palier pour des concentrations d'enzyme variant de 1 à 10 (valeur finale de l'azote non protéique, pratiquement constante).

Dans les deux cas (2 et 12 p. 100 de TCA) la vitesse initiale est proportionnelle à la quantité d'enzyme. Dans le deuxième cas (12 p. 100 de TCA) elle devient nulle pour une valeur fixe d'azote non protéique : 1,5 p. 100 de N-caséine soit 0,10 mg N/ml de solution de caséine à 4 p. 100. Dans le premier cas (2 p. 100 de TCA) la première partie de la courbe s'achève à une valeur qui varie peu avec les trois concentrations d'enzyme utilisées ; cette valeur peut être estimée en prolongeant la droite finale de chaque courbe jusqu'au temps zéro ; la valeur moyenne représente 3,8 p. 100 de N-caséine soit 0,25 mg N/ml de solution de caséine.

La différence entre les valeurs obtenues à 2 et à 12 p. 100 de TCA, à la fin de la première partie de la courbe, peut signifier que plusieurs substances sont libérées au cours de la réaction ou que la même substance présente une solubilité variable suivant la concentration en TCA. Mais nous verrons plus loin qu'il faut tenir compte, dans l'interprétation de ces résultats, de l'adsorption de substances solubles sur le précipité, qui se manifeste à 12 p. 100 de TCA et non à 2 p. 100.

Il apparaît donc qu'avec la déprotéinisation à 2 p. 100 de TCA, on peut suivre le cours d'une deuxième réaction, distincte de la réaction que l'on observe seule à 12 p. 100 de TCA. Celle-ci est vraisemblablement la réaction primaire ; tandis que l'autre peut être considérée comme une réaction de protéolyse générale, car elle ne présente pas le caractère spécifique de la précédente.

Les différences les plus apparentes entre ces deux réactions concernent :

1. — La vitesse : elle est initialement très grande dans la réaction primaire et beaucoup plus faible dans la réaction générale.

2. — La limite : la réaction primaire est une réaction enzymatique très limitée. Au contraire, la réaction générale se poursuit bien au-delà du temps de coagulation.

3. — La solubilité des produits de la réaction : ceux de la réaction générale sont insolubles dans 12 p. 100 de TCA.

4. — La spécificité : la réaction primaire n'a été observée qu'avec la caséine entière, la caséine α et la caséine κ . La réaction protéolytique générale peut se produire avec d'autres substrats ; elle peut être dissociée de la première lorsque l'action de la présure se produit à un pH bas, vers 2,0 ; alors, la réaction primaire est absente, comme l'ont montré NITSCHMANN et BOHREN (27).

N. B. — La valeur de NPN-O (sans présure) ne change pas pendant la durée des expériences, ni le pH de la solution.

Le chauffage préalable de la solution de caséine, à 80°C pendant 10 mn, ne change pas non plus les résultats.

V. — Influence de la concentration du substrat sur la quantité d'azote non protéique

Le tableau 5 résume les résultats d'expériences faites avec 4 solutions de caséine, dont les concentrations sont comme 1 — 3,2 — 10 — 12, et avec quatre concentrations de TCA, la quantité de présure étant constante (0,3 UP/ml, soit 4 µg/ml). Les dosages sont faits après 45 mn d'action de présure (début du palier de la courbe à 12 p. 100 de TCA).

TABLEAU 5

Influence de la concentration des solutions de caséine et de la concentration de TCA sur la quantité de NPN. (Augmentation du NPN après l'addition de la présure, en µg/ml et en p. 100 de N-caséine).

Concentration finale en TCA	Solution de caséine à							
	0,45 %		1,45 %		4,25 %		5,25 %	
	µg/ml	% N cas.	µg/ml	% N cas.	µg/ml	% N cas.	µg/ml	% N cas.
2	47	7,0	149	6,6	326	4,6	340	4,1
6	32	4,8	102	4,6	218	3,1	238	2,9
12	16	2,4	49	2,2	100	1,5	107	1,3
21,5	8	1,2	28	1,2	40	0,6	41	0,5
(Avant action de la présure) de 2 à 21,5 % TCA	5	0,7	7	0,3	10	0,15	18	0,2

Pour une concentration donnée de TCA, la quantité d'azote non protéique (qui est en relation avec la vitesse de la réaction), par ml de solution de caséine, varie beaucoup avec la concentration de cette dernière. Elle paraît être proportionnelle à la concentration du substrat pour des solutions à 0,45 et 1,45 p. 100 (figure 16) ; pour les solutions plus concentrées : 4,25 et 5,25 p. 100, la vitesse est moins grande. En conséquence la proportion de NPN p. 100 N-caséine est moins élevée dans ces solutions concentrées. On peut supposer qu'il y a inhibition par excès de substrat, ou que le NPN est en partie adsorbé sur le précipité.

VI. — Influence du mode de précipitation par l'acide trichloracétique sur la quantité d'azote non protéique

1. — On peut vérifier la dernière explication ci-dessus en modifiant les conditions de la déprotéinisation par TCA de manière que la même quantité de protéine soit présente dans le mélange, quelle que soit la concentration de la caséine dans la solution emprésurée. Dans les expériences précédentes le volume des différentes solutions de caséine était le même (conditions A), donc la quantité de protéine dans le mélange avec TCA variait beaucoup. Dans les nouvelles expériences que nous avons faites, le volume de chaque solution de caséine, mélangé avec TCA, est inversement proportionnel à la concentration de la caséine (conditions B).

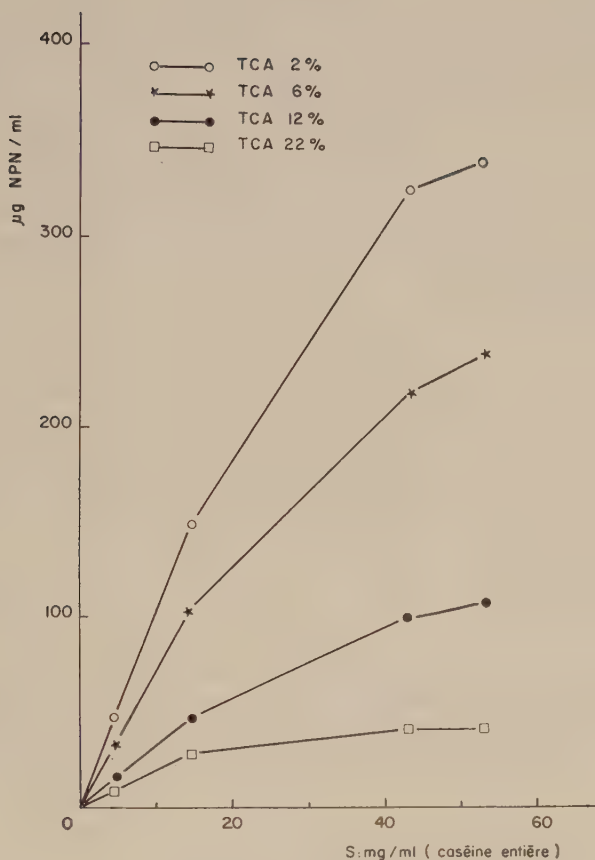


FIG. 16. — Quantité de NPN à différentes concentrations de caséine et d'acide trichloracétique

pH 6,8 ; 25°C.
 c : 4 µg/ml (présure cristallisée).

Le tableau 6 résume les résultats d'expériences comparatives, à 12 et à 2 p. 100 de TCA. On voit que le mode de déprotéinisation a une grande influence lorsque la concentration finale de TCA est 12 p. 100. Les proportions d'azote non protéique trouvées dans les conditions habituelles (A) avec les solutions à 4,4, 2,2 et 1,1 p. 100 de caséine sont : 1,8, 2,3 et 3, 1p. 100 ; alors que dans les conditions (B) (donnant le même volume de précipité) la même proportion est obtenue avec les trois solutions : 1,3, 1,4 et 1,4 p. 100. Il est donc probable qu'intervient l'adsorption de substances solubles sur le précipité.

On ne constate pas de telles différences lorsque la concentration de TCA est 2 p. 100 ; le précipité est d'ailleurs plus dispersé (sous forme de flocons), qu'à 12 p. 100 de TCA.

TABLEAU 6

Influence du mode de précipitation par l'acide trichloracétique

	12 % TCA				2 % TCA			
	$\mu\text{g N/ml}$ filtrat		NPN % N-caséine		$\mu\text{g N/ml}$ filtrat		NPN % N-caséine	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Augmentation de NPN après 90 mn d'action de la présure (*) sur les solutions de caséine à :								
4,4 %	23,7	18,6	1,8	1,3	54,1	54,0	4,0	3,8
2,2 %	15,5	19,1	2,3	1,4	32,4	67,6	4,7	5,0
1,1 %	10,3	19,1	3,1	1,4	19,6	87,5	5,8	6,5
NPN-O (avant l'action de la présure)								
Solution à :								
4,4 %	3,8	3,4	0,27	0,25	4,7	5,6	0,34	0,44
2,2 %	2,3	3,1	0,36	0,23	4,4	5,6	0,70	0,44
1,1 %	1,7	3,1	0,48	0,23	5,7	6,0	1,67	0,45

A et B : Voir le texte.

(*) : 0,1 UP, soit 1,35 $\mu\text{g/ml}$.

2. — Une autre expérience, entreprise dans le but d'obtenir des filtrats trichloracétiques plus riches en substances azotées non protéiques, a révélé l'influence du volume du mélange, dans la déprotéinisation à 12 p. 100 de TCA, sur la quantité d'azote non protéique. Les résultats sont résumés dans le tableau 7 ; ils ont été

TABLEAU 7

*Influence du volume du mélange dans la déprotéinisation
sur la quantité de NPN (*)*

Volumes de TCA ajoutés à 1 volume de solution de caséine à 4 %	Déprotéinisation à 12 % TCA		Déprotéinisation à 2 % TCA	
	$\mu\text{g N/ml}$ filtrat	NPN % Nt	$\mu\text{g N/ml}$ filtrat	NPN % Nt
(a) 4.....	26	1,9	51	3,7
(b) 2.....	36	1,6	84	3,7
(c) 1.....	50	1,45	128	3,7

(*) Après 45 mn d'action de 0,03 UP soit 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de présure cristallisée.

obtenus de la manière suivante : la même solution de caséine, après 45 mn d'action de la présure, est précipitée en ajoutant à 1 volume de solution de caséine :

- a) — 4 volumes TCA à 15 p. 100 (conditions habituelles) ;
- b) — 2 volumes TCA à 18 p. 100 ;
- c) — 1 volume TCA à 24 p. 100.

La même quantité de protéine est présente dans les trois cas ; mais le précipité se forme dans un volume de liquide variant de 5 à 2. Dans l'expérience (a) le précipité est floconneux ; dans les expériences (b) et surtout (c), où le volume du mélange est plus petit, il a la consistance d'une pâte assez ferme. On voit que la proportion d'azote non protéique est d'autant plus faible que le volume du mélange est plus petit et que le précipité de protéine est plus compact.

L'expérience a été répétée à 2 p. 100 de TCA ; dans ce cas on ne constate pas de différences. Le précipité reste floconneux dans les 3 mélanges.

3. — L'influence des conditions dans lesquelles la protéine, ayant subi l'action d'un enzyme, est séparée des produits solubles de la réaction a été mise en évi-

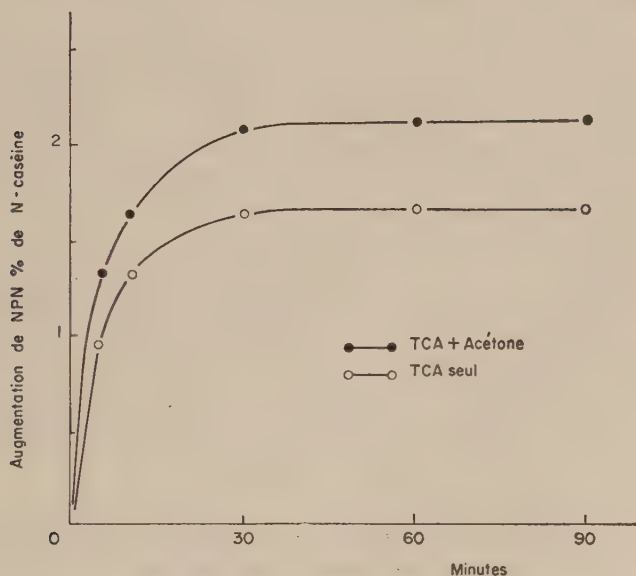


FIG. 17. — Courbes de NPN avec et sans acétone

e : 0,65 $\mu\text{g/ml}$ (présure cristallisée) ;
 s : 20 mg/ml (caséine entière) ;
 pH 6,8 ; 25°C.
 TCA : 12 %

dence par JACOBSEN (118). Cet auteur a obtenu une plus forte proportion de substances solubles, en ajoutant de l'acétone à l'acide trichloracétique. Nous avons essayé cette addition. La figure 17 montre que la précipitation à 12 p. 100 de TCA et 10 p. 100 d'acétone donne en effet une proportion d'azote non protéique plus élevée que la précipitation habituelle, avec TCA seul. Dans ce dernier cas, la valeur finale ne représente que de 79 à 86 p. 100 de la valeur obtenue en présence d'acétone. La valeur du NPN-O est aussi légèrement plus faible sans acétone (0,19 p. 100 de N-caséine) qu'en présence d'acétone (0,23 p. 100).

En ce qui concerne la précipitation avec 2 p. 100 de TCA, on ne constate aucune différence, que le réactif contienne de l'acétone ou qu'il n'en contienne pas.

Conclusion.

Les expériences précédentes montrent que la proportion des substances solubles dépend (en dehors de la concentration de l'enzyme et du substrat dans le mélange réactionnel) :

1. — de la concentration de l'acide trichloracétique dans le mélange en cours de déprotéinisation.
2. — de la concentration de la caséine dans ce même mélange.
3. — des conditions expérimentales : manière de mélanger l'acide trichloracétique, présence d'acétone dans l'acide trichloracétique.

Il faut cependant remarquer que, lorsque l'on fait varier les conditions 2 et 3, à 12 p. 100 de TCA, la courbe de formation de l'azote non protéique en fonction du temps conserve la même forme ; seule change la valeur finale. Il est probable que l'adsorption de substances solubles sur le précipité est responsable de la diminution de cette valeur finale. Cette adsorption est d'autant plus grande que la quantité de caséine est plus élevée dans le mélange et que les conditions de l'expérience favorisent la formation d'un précipité plus compact.

En pratique, pour la commodité des opérations d'extraction des substances azotées non protéiques, nous nous sommes placés dans les conditions qui en donnent une quantité élevée par centimètre cube de filtrat ; nous avons donc utilisé des solutions de caséine relativement concentrées (3 à 4 p. 100) et nous avons fait la déprotéinisation selon la condition (c) du tableau 7. Nous ne sommes donc pas dans les conditions qui donnent la plus forte proportion d'azote non protéique.

VII. — Absorption à 280 m μ et formation de l'azote non protéique par la présure et par une protéase bactérienne

L'absorption à 280 m μ du filtrat trichloracétique à 12 p. 100 ne varie pas au cours de l'action de la présure ; elle demeure égale à la valeur très faible qu'elle avait au temps zéro (avant action de la présure) et qui correspond à 0,035 mg/ml de caséine soluble dans TCA, dans le cas de l'expérience représentée sur la figure 18. Après l'action de la présure, il s'est ajouté 0,417 mg/ml de substances azotées, qui ne présentent donc pas l'absorption caractéristique des acides aminés aromatiques.

Pour illustrer les différences existant entre la présure et d'autres protéases, réagissant sur la caséine et capables de coaguler le lait, nous présentons dans la figure 18 les résultats d'expériences comparatives effectuées dans les conditions suivantes :

— sur une même solution de caséine entière de vache, nous avons fait réagir, d'une part, la présure cristallisée, d'autre part une protéase bactérienne, qui peut être utilisée dans la fabrication de certains fromages. Cette protéase est extraite des cultures d'une souche de *Bacillus mesentericus*. Les quantités d'enzymes sont choisies de manière à coaguler un lait de mélange dans le même temps : 20 minutes à 30°C.

La protéase provoque la formation de substances azotées solubles dans TCA à 12 p. 100 qui présentent l'absorption caractéristique des acides aminés aromatiques ; de plus, la formation de ces substances se poursuit bien au-delà du temps correspondant au temps de coagulation et à l'achèvement de la réaction primaire ; elle n'est pas limitée à une valeur finale, comme dans le cas de la présure. La courbe de NPN en fonction du temps, que nous avons obtenue avec la protéase, est semblable à celle que MATTENHEIMER et NITSCHMANN (32) ont obtenue avec la chymotrypsine réagissant sur la caséine de vache.

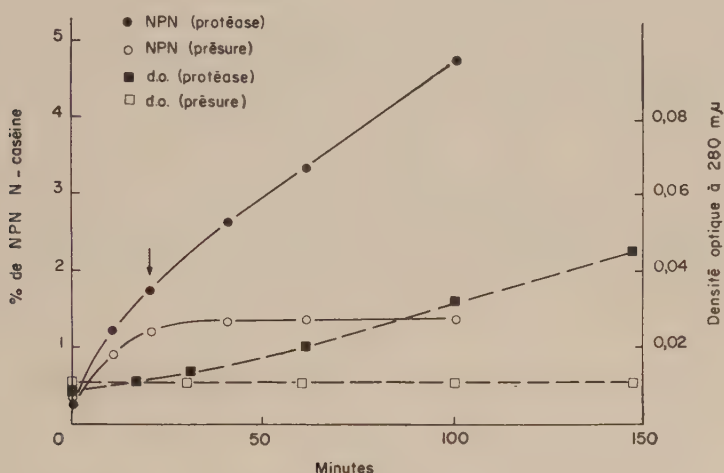


FIG. 18. — Action d'une protéase bactérienne sur la caséine
 e : 5 $\mu\text{g/ml}$ (protéase) et 0,27 $\mu\text{g/ml}$ (présure) ;
 s : 25 mg/ml (caséine entière) ;
 pH 6,8 ; 30°C.

VIII. — Formation de l'azote non protéique à partir de la caséine α et de la caséine κ

A. CASÉINE α

La caséine α préparée par la méthode à l'urée (chapitre I) est exempte des fractions β et γ . Nous avons dit au chapitre précédent qu'elle n'est pas homogène ; elle renferme la caséine κ , insensible au calcium, et la caséine α_s , sensible au calcium, et, peut-être, des constituants mineurs mal connus.

La présure réagit avec la caséine α de la même façon qu'avec la caséine entière. Toutefois, dans nos expériences, nous avons obtenu des proportions d'azote non protéique à 12 p. 100 de TCA plus variables qu'avec la caséine entière, dans des conditions fixes de déprotéinisation. Après 60 minutes d'action de 0,03 UP/ml, et en ajoutant 1 volume de TCA à 24 p. 100 à 1 volume de solution de caséine à 3 p. 100, ces proportions sont :

1^{re} préparation de caséine α , NPN = 0,86 et 1,12 p. 100 de N-caséine.

2^e préparation de caséine α , NPN = 1,67 et 1,92 p. 100 de N-caséine.

Dans les mêmes conditions, la caséine entière donne de 1,5 à 1,9 p. 100 de NPN. Les résultats ci-dessus permettent de penser que le traitement de la caséine entière, aboutissant à la séparation d'une fraction homogène à l'électrophorèse à pH 8,6 et de mobilité — 6,5, laisse une quantité variable, dans la caséine α , du composant qui est le vrai substrat de l'enzyme.

B. — CASÉINE α

Avec la caséine α , nous avons obtenu des courbes de NPN $f(t)$ à 12 p. 100 de TCA de forme comparable à celles de la caséine entière et de la caséine α ; mais la proportion des produits solubles, après l'accomplissement de la réaction primaire, est environ 5 fois plus élevée qu'avec la caséine entière (tableau 8).

TABLEAU 8
Formation de NPN à partir de la caséine α

Caséine α	s (*)	e (*)	NPN % de N caséine			
			à 12 % TCA (**)		à 2 % TCA (***)	
			Temps 0	Augmentation après 60 mn	Temps 0	Augmentation après 60 mn
n° 1 a.....	1,56	0,05	1,15	8,95		
b.....	1,49	0,05	1,63	8,10		
n° 2 a.....	1,27	0,03	0,75	8,00	3,2	15,0
b.....	1,25	0,05			2,5	16,6
Caséine entière (qui a servi à préparer la caséine n° 2)	1,33	0,03	0,21	1,55	0,3	3,65

(*) s : concentration de la caséine : g/100 ml. e : concentration de la présure cristallisée : UP/ml.

(**) 1 volume de TCA 24 % ajouté à 1 volume de solution caséine α .

(***) 1 volume de TCA 4 % ajouté à 1 volume de solution de caséine α .

Le fait que la caséine α subit une dégradation beaucoup plus importante que les caséines plus complexes dont elle est issue, est en faveur de la conception du substrat spécifique de l'enzyme, dans la réaction primaire.

Si l'on admet que les substances azotées non protéiques (à 12 p. 100 de TCA) proviennent entièrement de la caséine α ; les proportions indiquées dans le tableau 8 (caséine n° 2) permettent de calculer que la caséine entière doit contenir 19 p. 100 de caséine α ($1,55 \times 100/8$). Nous avons obtenu une valeur presque identique d'après la composition glucidique (18 p. 100).

Avec la caséine α , comme avec la caséine entière, la proportion d'azote non protéique formé dépend de la concentration du substrat. De même, à 2 p. 100 de TCA il y a environ deux fois plus d'azote non protéique qu'à 12 p. 100.

La valeur « NPN-O » est toujours plus élevée avec la caséine α qu'avec la caséine entière ou la caséine α . La solubilité apparente de la caséine α dans TCA n'est donc pas négligeable; nous reviendrons sur cette question au chapitre suivant.

Il est à noter qu'avec la caséine α , la concentration de l'azote non protéique dans les filtrats à 12 p. 100 de TCA (jusqu'à 0,100 mg/ml) est bien supérieure à celle que l'on a constatée avec la caséine entière (jusqu'à 0,050 mg/ml) dans les mêmes conditions expérimentales. S'il s'agit, dans les deux cas, de la même substance, on peut en déduire que le filtrat trichloracétique obtenu avec la caséine entière n'est pas saturé en NPN et que le palier de la courbe caractéristique représente bien l'achèvement de la réaction primaire (figure 13, 15, 17).

IX. — Les produits solubles séparés sans addition d'acide trichloracétique

(Rappelons que la figure 4 — chap. III — schématise les divers modes de séparation.)

a) Nous avons vu que la « *protéose de HAMMARSTEN* » contient les substances détachées de la caséine sous l'action de la présure et solubles après la coagulation en présence de Ca^{2+} . Il est difficile de suivre leur formation en fonction du temps. La proportion d'azote passé en solution après la coagulation est environ 3 à 4 fois plus élevée que la proportion de NPN à 12 p. 100 de TCA et un peu plus élevée que celle de NPN à 2 p. 100 de TCA comme le montre le tableau 9.

TABLEAU 9

Proportions d'azote soluble, après action de la présure, dans différentes conditions de séparation

Conditions de séparation des produits solubles	Produits solubles % de N-caséine (*)		
	Au temps 0	Après 60 mn d'action de présure	Augmentation
TCA 12 %	0,10	1,70	1,60
TCA 2 %	0,35	4,5	4,15
pH 4,65	0,95	4,85	3,90
Coagulation (+ Ca^{++})	—	6,1	—

(*) — solution à 4 % de caséine entière ; présure : 0,06 UP soit 0,8 $\mu\text{g/ml}$.

b) NITSCHMANN (26) considère que les *substances solubles à pH 4,6-4,7*, après l'action de la présure sur la caséine, constituent également la protéose. Dans nos expériences nous avons obtenu moins de substances solubles à pH 4,6 qu'après la coagulation, dans les mêmes conditions d'action de la présure (tableau 9). Nous avons d'ailleurs constaté que le sérum de coagulation, dont le pH est approximativement celui du substrat originel, laisse déposer une partie insoluble après acidification à pH 4,6.

Avec une solution sodique de caséine, on peut suivre la formation des substances solubles à pH 4,6 en fonction du temps. Nous avons ainsi obtenu des courbes semblables à celles que l'on obtient avec l'acide trichloracétique à 2 p. 100 de concentration finale. La question se pose de savoir s'il s'agit des mêmes substances solubles ? Nous essaierons d'y répondre dans le chapitre suivant.

c) La caséine α forme un précipité de paracaséine sous l'action de la présure

en l'absence de calcium (chapitre VII). La proportion d'azote de la caséine restant dans le surnageant est environ deux fois plus élevée que la proportion de NPN-12 p. 100. Il est possible que le surnageant contienne plusieurs substances azotées, dont une partie précipite par addition de TCA à 12 p. 100.

X. — Formation de l'azote non protéique avec des caséines particulières et des caséines d'autres espèces

a) La réaction enzymatique spécifique de la présure paraît être indépendante de certaines modifications importantes des propriétés de la caséine. C'est ce que montre une expérience effectuée avec une *vieille préparation de caséine* de vache, séchée à l'air, conservée 2 ans et demi, et devenue insoluble en présence de calcium. Nous avons obtenu avec cette caséine, soumise à l'action de la présure, une courbe de NPN à 12 p. 100 de TCA identique à celle que nous avons précédemment présentée pour la caséine fraîche. Or, la caséine « vieillit » ; comme l'ont montré NITSCHMANN et NAGELI (119) ; sa sensibilité aux ions Ca^{2+} augmente considérablement. La figure 19 montre que la courbe de précipitation de la caséine âgée de 2 ans et demi, en présence de quantités croissantes de chlorure de calcium, est très différente de celle de la caséine fraîche et devient très voisine de celle de la paracaséine (cette dernière courbe a été établie par NITSCHMANN et LEHMANN (16)).

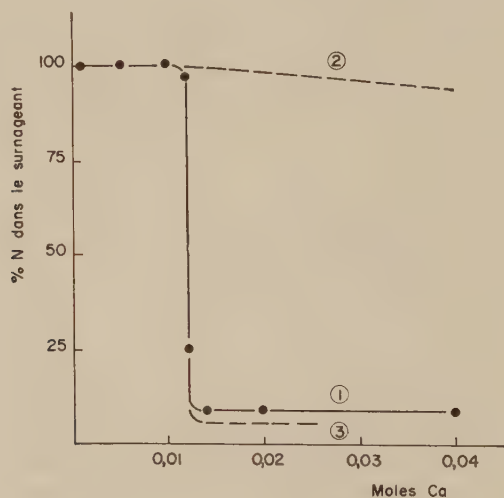


FIG. 19. — Courbes de précipitation par le calcium
 s : 30 mg/ml (caséine entière) pH 6,8 ; 20°C ;
 (1) vieille caséine ;
 (2) caséine fraîche ;
 (3) paracaséine (d'après NITSCHMANN et LEHMANN (16)).

b) Avec les *caséines de chèvre et de brebis*, nous avons obtenu des courbes d'azote non protéique, au cours de l'action de la présure, comparables à celles qui ont été obtenues avec la caséine de vache.

La caséine de chèvre donne les mêmes proportions d'azote non protéique que la caséine de vache, à 12 p. 100 de TCA et à pH 4,6.

La caséine de brebis se distingue des deux précédentes par la proportion des produits solubles. La figure 20 montre que la proportion d'azote non protéique (12 p. 100 de TCA) et celle de l'azote soluble à pH 4,6 sont voisines l'une de l'autre, avec cette caséine, et sont bien différentes des proportions que l'on constate avec la caséine de vache. Dans deux expériences comparatives, la caséine de brebis a donné 1,4 et 1,6 fois plus de NPN que la caséine de vache ; mais elle donne moins d'azote soluble à pH 4,6 que cette dernière.

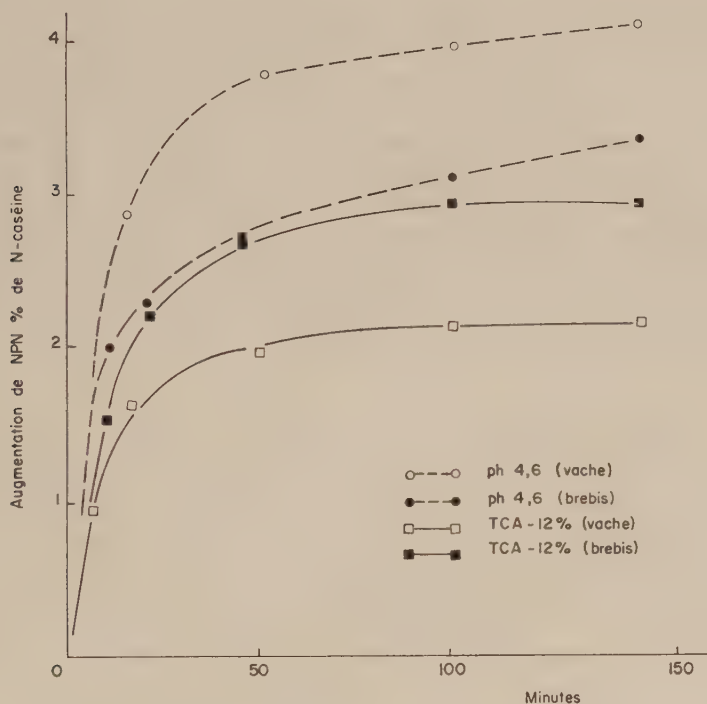


FIG. 20. — Formation de NPN à partir de la caséine de brebis

e : 0,77 $\mu\text{g/ml}$ (présure cristallisée) ;
 s : 25 mg/ml (caséine entière de brebis ou de vache) ;
 pH 6,8 ; 25°C.

Avec la préparation incomplètement purifiée de caséine α de brebis que nous avons obtenue, la proportion de NPN à 12 p. 100 de TCA s'est élevée à 13 p. 100 de N-caséine, dans les mêmes conditions que celles de l'expérience n° 1 (a) du tableau 8 avec la caséine α de vache (8,95 p. 100).

c) Avec la caséine humaine, nous avons obtenu des résultats bien différents des précédents. Quatre préparations ont été étudiées ; trois d'entre elles n'ont pas donné lieu à la formation d'azote non protéique ; la quatrième en a donné une petite quantité (0,6 p. 100 de N-caséine), la valeur de NPN-O étant élevée (2 p. 100 de N-caséine).

A pH 4,6 on constate toujours la formation d'azote soluble, mais en proportion assez faible (1 à 2 p. 100) comparativement à la caséine de vache (4 p. 100); de plus la valeur du NPN-O est très élevée (6 p. 100).

XI. — Phosphore et acide sialique solubles dans l'acide trichloracétique après l'action de la présure

Les résultats que nous présenterons au chapitre suivant montrent que les substances azotées non protéiques contiennent du phosphore et des glucides. L'étude du passage en solution trichloracétique du phosphore et de l'acide sialique, détachés de la caséine après l'action de la présure, comparativement au passage en solution de l'azote, peut apporter des éclaircissements sur la nature des substances solubles.

a) Dans 4 expériences, avec la caséine entière et la caséine α de vache et avec la caséine de chèvre, nous avons déterminé le phosphore et l'azote dans le filtrat trichloracétique obtenu en précipitant le mélange caséine + présure, après divers temps de réaction. La figure 21 montre les résultats d'une de ces expériences avec la caséine entière de vache. La courbe représentant la libération de phosphore non protéique soluble dans TCA à 12 p. 100 a la même forme que la courbe de l'azote non protéique; mais elle ne lui est pas parallèle.

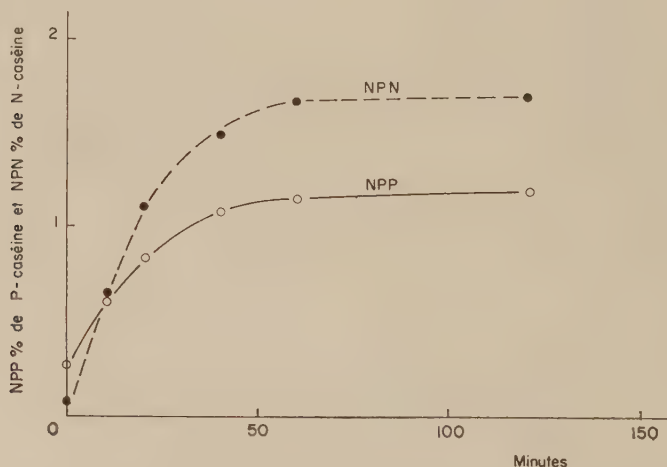


FIG. 21. — Phosphore non protéique libéré par la présure (NPP)

s : 25 mg/ml (caséine α de vache);
e : 0,27 μ g/ml (présure cristallisée);
pH 6,8; 25°C.

Avant l'addition de présure, la proportion de phosphore passant en solution est toujours plus élevée que celle de l'azote; après l'action de la présure on constate le contraire. Le rapport P/N dans le filtrat trichloracétique va en diminuant régulièrement au cours de la réaction, en partant du temps zéro. Mais si l'on ne tient

compte que du phosphore et de l'azote passés en solution après l'addition de la présure, ce rapport reste sensiblement constant, comme le montre le tableau 10 et il est toujours nettement inférieur à ce qu'il est dans la caséine originelle.

TABLEAU 10

Phosphore non protéique (NPP) formé au cours de l'action de la présure ()*

	P/N caséine	P/N dans le filtrat trichloracétique				NPP % P-caséine	
		Temps 0	Après action de la présure (**)				Augmen- tation après 60 mn
			15 mn	40 mn	60 mn	120 mn	
1) TCA 12 %							
Caséine de vache :							
— entière	0,056	0,17	0,030	0,032	0,035	0,032	0,25
— α	0,062	0,12	0,040	0,042	0,041	0,040	0,29
Caséine de chèvre	0,058	0,23	0,050	0,048	0,049	—	0,28
2) TCA 2 %							
Caséine de vache :							
— entière	0,056	0,05	0,036	0,038	0,034	0,030	0,40

(*) — 0,03 UP soit 0,4 $\mu\text{g/ml}$.

(**) — Valeurs au temps 0 déduites.

Il est donc possible qu'une seule substance passe en solution dans TCA à 12 p. 100 au cours de l'action de la présure. Les rapports P/N montrent que le NPN de chèvre devrait être plus riche en phosphore que celui de vache ; si ces deux substances avaient la même teneur en azote.

On remarque que la petite fraction de la caséine, qui est solubilisée par 12 p. 100 de TCA (sans action de la présure) est beaucoup plus riche en phosphore que le NPN proprement dit et que la caséine. Si cette fraction avait la même teneur en azote que la caséine (14,8 p. 100), elle contiendrait respectivement : 2,7 — 1,9 et 3,6 p. 100 de phosphore, dans le cas des 3 caséines du tableau 10.

A 2 p. 100 de TCA une expérience avec la caséine entière de vache montre que le rapport P/N, après action de la présure, est voisin de ce qu'il est à 12 p. 100 mais qu'au temps 0 il est beaucoup plus faible.

b) Nous avons suivi, en fonction du temps d'action de la présure, la quantité d'acide sialique, exprimée en acide N-acétylneuraminique (NANA), se retrouvant dans le filtrat trichloracétique, avec la caséine α comme substrat. Nous avons obtenu des résultats présentés dans le tableau 11, qui vont en sens contraire des précédents.

Le rapport NANA/N varie très peu, la valeur au temps zéro étant déduite, comme dans le cas du rapport P/N. Mais, dans le cas de l'acide sialique, la présure détache une ou des substances considérablement plus riches que la caséine originelle et que la fraction soluble au temps zéro.

Les courbes de formation de l'acide neuraminique ont la même allure que celles du NPN. Elles atteignent un palier horizontal avec 12 p. 100 de TCA. Mais la proportion de NANA solubilisé est considérablement plus élevée que celle de l'azote.

TABLEAU II

Acide sialique (NANA) non-protéique formé au cours de l'action de la présure

	NANA/N caséine	NANA/N dans le filtrat trichloracétique					NANA soluble % de NANA caséine	
		Temps 0	Après action de la présure				Temps 0	Augment. apr. 60 mn
			5 mn	15 mn	30 mn	60 mn		
Caséine α (*)								
TCA 12 %	0,17	0,21	1,16	1,20	1,18	1,19	2,68	64,0
TCA 2 %	0,17	0,23	0,64	0,56	0,57	0,57	6,60	79,4

(*) Solution à 0,4 g/100 ml.

Ces résultats, concernant le phosphore et l'acide neuraminique, permettent de conclure que, sous l'action de la présure, des fragments se détachent qui ont certainement une composition très différente de celle de la caséine. Par rapport à la protéine originelle, le NPN est appauvri en phosphore et fortement enrichi en acide sialique. Les 2/3 de l'acide sialique de la caséine α se retrouvent dans la partie non protéique, après l'action de la présure ; le réactif seul (TCA) ne fait passer en solution que 2,68 p. 100 de l'acide sialique de la caséine.

CHAPITRE IX

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DES PRODUITS DE LA RÉACTION

I. — Comportement au cours de la dialyse contre l'eau

A. — SUBSTANCES AZOTÉES DU FILTRAT TRICHLORACÉTIQUE (NPN)

Le dosage de l'azote, avant et après dialyse, montre que les substances azotées formées au cours de la réaction de la présure sur la caséine et solubles dans l'acide trichloracétique restent à l'intérieur du sac de dialyse (cellulose « Nojax ») dans une proportion variant de 90 à 97 p. 100. Ces substances ont probablement un poids moléculaire relativement élevé, bien qu'elles soient solubles dans l'acide trichloracétique.

On peut supposer que les substances dialysables proviennent de la fraction de la caséine qui est soluble dans TCA avant l'action de la présure ; car la faible perte d'azote au cours de la dialyse paraît être proportionnelle à la quantité de NPN-O, comme le montre le tableau 12. Ainsi, avec la caséine κ , la perte d'azote est plus élevée qu'avec la caséine entière ou la caséine α , mais la quantité de NPN-O est également plus élevée. Dans tous les cas, la proportion d'azote dialysable est un peu inférieure à celle du NPN-O. Nous verrons plus loin que les $3/4$ du NPN-O, de la caséine κ sont éliminés par la dialyse.

TABLEAU 12

Dialyse des substances azotées non protéiques

Substances	p. 100 de N-caséine		p. 100 de NPN final	
	NPN-O	NPN final	NPN-O	N-dialysable
NPN (12 %) (de caséine entière) ..	0,09	1,75	5	3
NPN (12 %) (de caséine α)	0,11	1,12	10	6
NPN (12 %) (de caséine κ)	1,15	10,0	11,5	10
NPN (2 %) (de caséine entière) ...	0,35	4,5	12	8
Protéose soluble à pH 4,6 (de caséine entière)	0,95	4,85	20	14
Sumageant de la paracatéine κ	—	18,0	—	9,0

Au cours de la dialyse, des substances pauvres en azote doivent être éliminées, car la teneur en azote de la substance non dialysable augmente avec la prolongation de la dialyse. Ces substances dialysables ne sont pas uniquement des sels, étant donné que le diagramme d'électrophorèse se simplifie, comme nous le verrons plus loin. Nous avons trouvé, par exemple, dans le cas d'une préparation provenant de la caséine α , les valeurs suivantes (azote p. 100 de substance sèche)

1. — après élimination de TCA par l'éther : 6,6.
2. — après une dialyse de 3 jours : 9,2.
3. — après une nouvelle dialyse de 5 jours : 10,8.

Cette propriété des substances azotées non protéiques a permis de les purifier par la dialyse, qui élimine non seulement le TCA, mais aussi les sels, alors que l'extraction par l'éther n'élimine pas ces derniers.

B. — PROTÉOSE SOLUBLE A pH 4,6

Les résultats de la dialyse sont comparables aux précédents (tableau 12). La fraction dialysable est en proportion relativement élevée ; mais le NPN-O est nettement plus important que ci-dessus.

C. — SURNAGEANT DE LA PARACASÉINE α

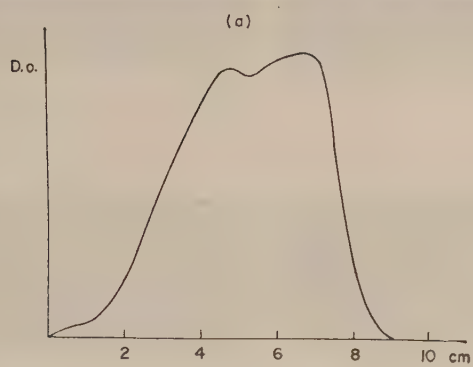
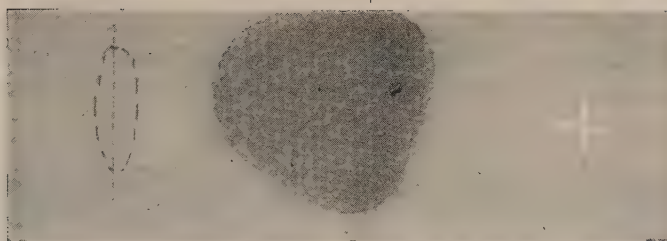
La proportion des substances azotées dialysables est du même ordre de grandeur que dans le cas du NPN (12 p. 100). On ne connaît pas la valeur au temps 0 du fait de la solubilité de la caséine α .

II. — Composition électrophorétique

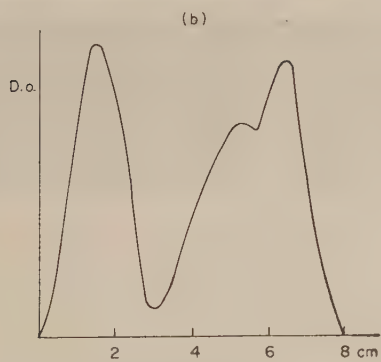
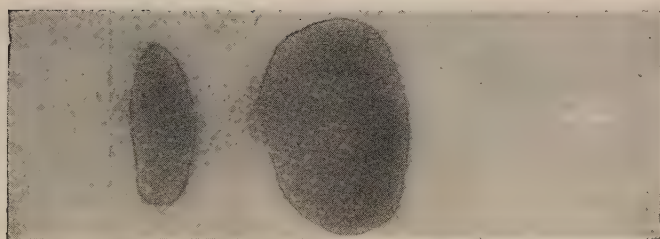
1) EXAMEN COMPARATIF

Les diagrammes d'électrophorèse présentés dans les figures 22 à 25 montrent des différences importantes entre les substances solubles à 12 p. 100 de TCA et les substances solubles dans les autres conditions de déprotéinisation : NPN à 2 p. 100 de TCA, protéose, substances contenues dans la surnageant après la coagulation de la caséine α .

La figure 22 montre le résultat d'un examen comparatif rapide par électrophorèse sur papier à pH 7,8, ainsi que les courbes correspondantes obtenues au « lecteur de bande ». Les deux substances examinées : NPN (12 p. 100) et NPN (2 p. 100) sont les premières que nous ayons préparées : elles ont été précipitées par l'acétone. On voit que le NPN (12 p. 100) est moins hétérogène que le NPN (2 p. 100) ; ce dernier contient au moins deux substances ayant des mobilités différentes.



(a) NPN (12 p. 100);



(b) NPN (2 p. 100).

FIG. 22. — Électrophorèse sur papier des substances NPN
pH 7,8 (tampon véronal/HCl), 110 volts, 5 mA, 8 heures;

2) LE NPN (12 P. 100). LE CASÉINO-GLYCOPEPTIDE

La figure 23 montre les résultats de l'examen de quatre préparations de NPN (12 p. 100) au moyen de l'électrophorèse selon TISELIUS, qui donne des indications plus précises que la méthode utilisée précédemment.

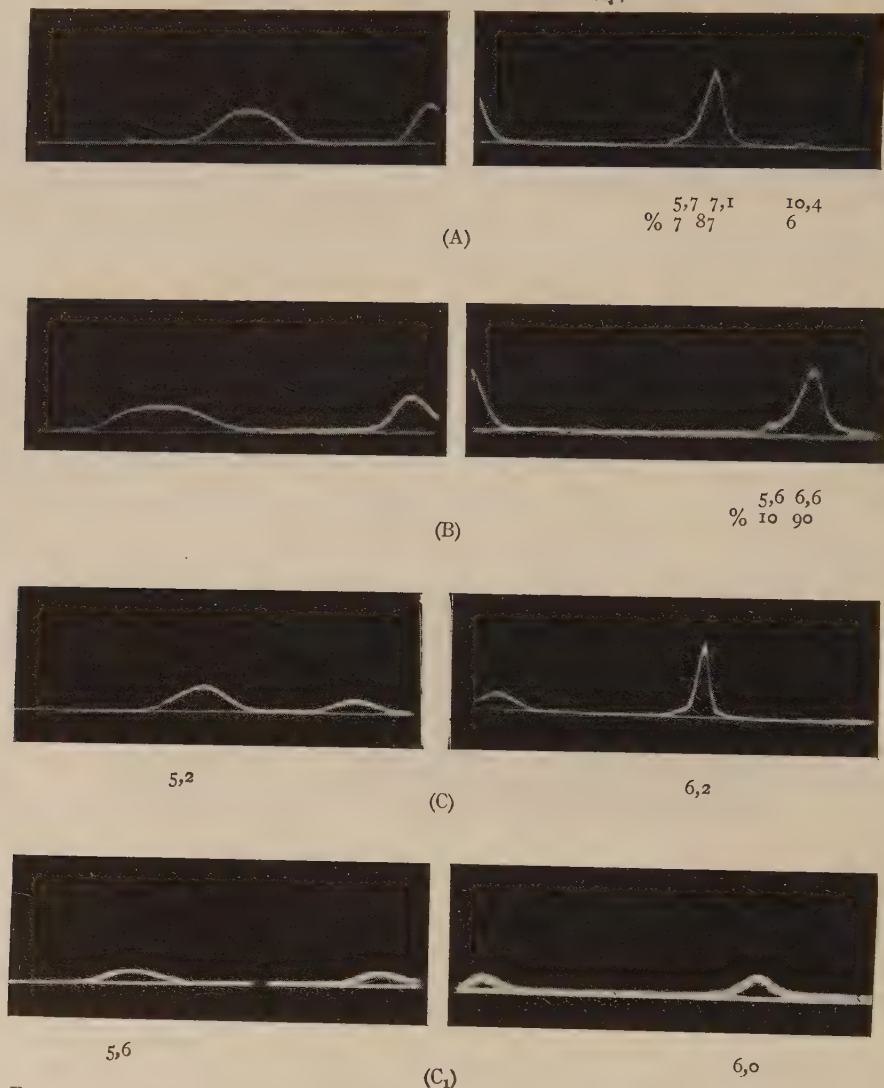


FIG. 23. — Diagrammes d'électrophorèse des substances NPN (12 p. 100) de caséine de vache
— pH 8,6 (véronal/véronal Na); force ionique 0,1;
— 8,2 volts/cm;
— à gauche : branche descendante;
— à droite : branche ascendante.
A. — NPN (12 p. 100) traité à l'éther, $c = 1,1$ p. 100, à 7 000 secondes;
B. — NPN (12 p. 100) dialysé 3 jours, $c = 1,0$ p. 100 à 11 000 secondes;
C. — NPN (12 p. 100) dialysé 9 jours, $c = 1,0$ p. 100, à 7 500 secondes;
C₁. — NPN (12 p. 100) de caséine α , dialysé 9 jours, $c = 0,9$ p. 100 à 10 000 secondes.

Comme dans le cas des caséines (chapitre VII), on constate des anomalies dans les diagrammes électrophorétiques des substances NPN. Les mobilités calculées sur les deux branches montrent des écarts importants. Les pics de la branche descendante sont étalés. Nous avons utilisé les mobilités calculées sur la branche ascendante qui sont obtenues avec le plus de précision.

Les trois premières préparations (A, B et C) ont été obtenues à partir de la caséine entière de vache ; la quatrième (C_1), à partir de la caséine α de vache.

A. — Substance préparée par lyophilisation du filtrat après épuisement à l'éther pour éliminer l'acide trichloracétique. Cette substance n'a subi que la courte dialyse précédant l'électrophorèse, qui permet d'atteindre l'équilibre avec la solution tampon.

B. — Substance extraite du même filtrat trichloracétique que A, mais après une dialyse de durée moyenne : 3 jours.

C. — Substance extraite d'un autre filtrat trichloracétique ayant subi une dialyse prolongée : 9 jours.

C_1 . — Préparation comme C, mais en partant de la caséine α .

La substance A contient trois constituants électrophorétiques ; celui qui a une mobilité moyenne (7,1) représente à lui seul 87 p. 100 de l'ensemble ; le plus mobile (10,4) disparaît de l'image après une longue durée de migration et le plus lent (5,7) n'apparaît nettement qu'après une assez longue durée de migration.

La substance B ne contient pas le petit constituant le plus mobile, quelle que soit la durée de l'observation. Une courte dialyse provoque donc son élimination ; par contre le constituant le plus lent persiste.

Dans le cas de la substance C, trois préparations provenant de filtrats trichloracétiques différents ont été examinés. Deux d'entre elles ont donné le diagramme d'une substance homogène, avec un seul pic de mobilité 6,2 (et 6,1 pour la deuxième non représentée sur la figure 23). Il en a été de même pour la substance C_1 . Par contre une troisième préparation de C, ayant subi la même dialyse que les précédentes, a donné un diagramme voisin de celui de la substance B (il n'est pas représenté sur la figure 23). Une nouvelle dialyse n'a pas fait disparaître le constituant lent. On peut se demander si ce dernier représente une impureté dialysable, ou s'il représente une association moléculaire du constituant principal, apparaissant dans certaines préparations ? Un essai de chromatographie sur Séphadex appuie cette deuxième hypothèse (voir plus loin).

Ce sont les substances longuement dialysées (9 jours), C et C_1 , qui ont été dénommées : « *caseino-glycopeptides* ».

Les substances D et E, provenant des caséines de brebis (D) et de chèvre (E), donnent des diagrammes d'électrophorèse plus simples que la substance correspondante de la caséine de vache (A). Le constituant peu mobile, qui forme un épaulement sur le pic correspondant au caséino-glycopeptide de vache, est absent. Par contre, le petit constituant très mobile n'est pas éliminé par une dialyse courte (comme dans la substance B) ; une dialyse prolongée (8 jours) l'a éliminé de la substance E (chèvre) mais non de la substance (D) brebis, (fig. 24).

On remarque que le constituant représentant le caséino-glycopeptide de brebis a une mobilité (8,0) sensiblement plus grande que celle des caséino-glycopeptides de vache et de chèvre ; ce qui dénote des différences dans la charge nette de la molécule.

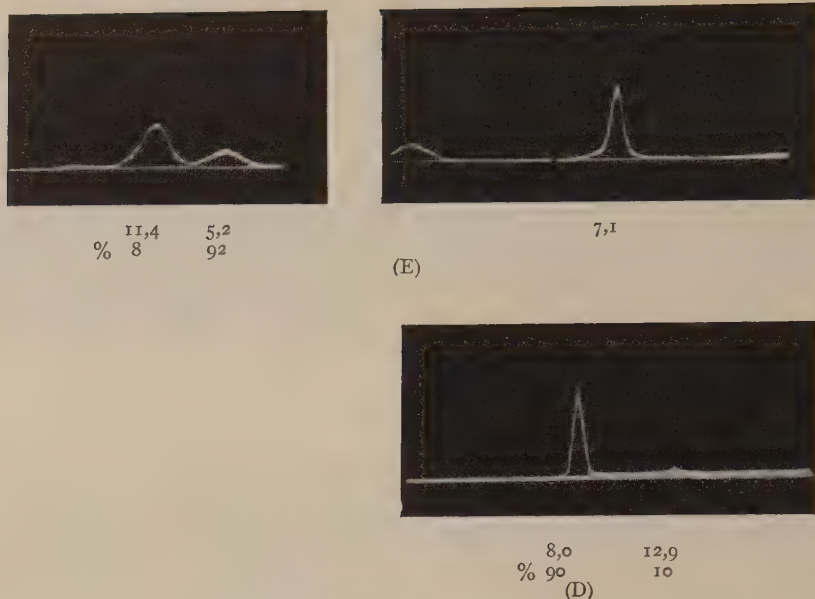


FIG. 24. — Diagramme d'électrophorèse des substances NPN (12 p. 100)
des caséines de chèvres et de brebis

- pH 8,6 (véronal-véronal Na); force ionique 0,1;
— 4,9 volts/cm.
E. — NPN (12 p. 100) de caséine de chèvre, dialysé, $c = 1$ p. 100; branche ascendante (à droite) à 10 500 secondes; branche descendante à 5 000 secondes
D. — NPN (12 p. 100) de caséine de brebis, dialysé, $c = 0,9$ p. 100, à 7 000 secondes (branche descendante opaque).

Le caséino-glycopeptide, provenant de différentes caséines, soumis à électrophorèse sur papier, à pH 3,6 et à pH 6,5, sous tension élevée (1 000 volts), ne donne qu'une tache après coloration à la ninhydrine. La figure 26 montre schématiquement l'examen de la substance C₂, caséino-glycopeptide provenant de la caséine α .

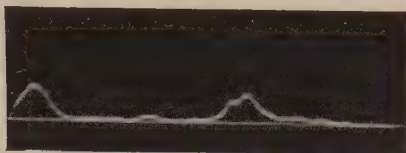
3) NPN (2 p. 100) ET PROTÉOSE

Nous avons examiné les substances suivantes provenant de la caséine entière de vache :

- F — NPN (2 p. 100) préparé comme la substance A;
G — NPN (2 p. 100) préparé comme la substance B;
H — Protéose extraite du surnageant de la coagulation de la caséine entière, en présence de calcium, sans dialyse;
I — Protéose de même origine, mais dialysée 3 jours;
J — Protéose extraite du filtrat après précipitation de la caséine à pH 4,6, dialysée 9 jours.

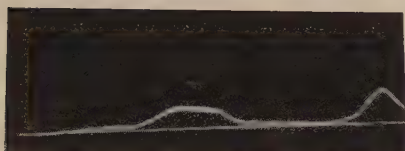
La figure 25 montre les diagrammes d'électrophorèse selon TISELIUS des substances F, H, I, J. On constate la présence de 5 à 7 constituants électrophorétiques ;

mais on remarque une grande similitude entre ces différentes substances. Dans chacune il y a un constituant dominant représentant environ 40 p. 100 du total et ayant une mobilité moyenne, comparable à celle du caséino-glycopeptide (6,9 6,8 6,5 et 6,05))



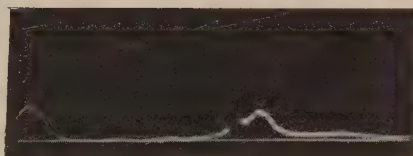
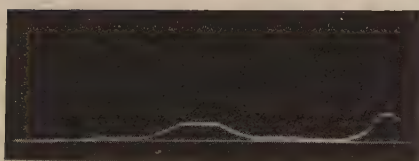
(F)

%	3,5	4,9	6,1	6,9	8,1	9,2	9,8
	11	5	27	37	10	8	2



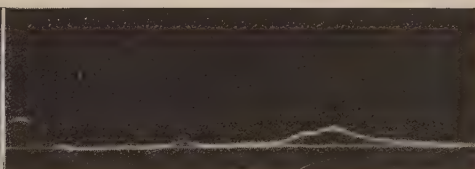
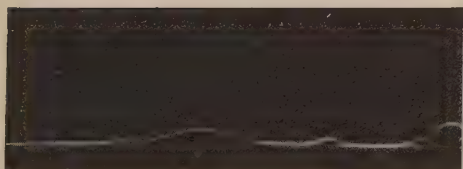
(H)

%	4	5,2	6,0	6,8	7,5	11,8
	3	4	20	47	10	16



(I)

%	2,6	4	5	5,9	6,5	7,3	8,8
	2	5	5	16	36	12	24



(J)

%	3	5,4	6	7	7,6
	11	27	46	11	5

FIG. 25. — Diagramme d'électrophorèse des substances NPN (2 p. 100) et de la « Protéose » de caséine de vache

(Conditions identiques à celles des examens de la figure 23)

F. — NPN (2 p. 100) non dialysé; $c = 0,9$ p. 100; à 7 800 secondes

H. — Protéose (de coagulation) non dialysée; $c = 1,1$ p. 100, à 8 500 secondes

I. — Protéose (de coagulation) dialysée; $c = 1,1$ p. 100, à 8 500 secondes

J. — Protéose (à pH 4,6); $c = 1$ p. 100, à 9 000 secondes.

Un deuxième constituant apparaît à une mobilité légèrement inférieure à celle du constituant dominant. Il se forme aussi une image d'un pic dédoublé retrouvé dans toutes les substances et formant de 52 à 73 p. 100 du total.

De part et d'autre de ces deux principaux constituants s'en trouvent plusieurs autres, représentant de 1/2 à 1/3 du total. Ils sont insolubles, ou très peu solubles, dans TCA à 12 p. 100 ; ils paraissent distincts par leur mobilité relative, des deux constituants mineurs du NPN (12 p. 100) (fig. 23, A). Il est possible qu'une partie de ces petits constituants représente des fragments de la molécule de caséine, sans rapport avec la réaction primaire de la présure. Nous reviendrons sur cette question.

La dialyse de durée moyenne (2 et 3 jours) du NPN (2 p. 100) (F) et de la protéose (I) modifie peu la composition électrophorétique. Cependant la substance J, qui a subi une longue dialyse et perdu 14 p. 100 d'azote, ne contient que 5 composants et la proportion des deux composants principaux est plus élevée que dans les autres substances examinées.

Le constituant dominant correspond bien au caséino-glycopeptide soluble dans 12 p. 100 de TCA. En effet nous avons préparé le caséino-glycopeptide en passant par le NPN (2 p. 100) (voir plus loin) ; nous avons ainsi obtenu une substance identique à C et C₁.

4) SURNAGEANT DE LA PARACASÉINE α

Le surnageant desséché (substance L) a été examiné par électrophorèse sur papier, à deux valeurs de pH : 3,6 et 6,5 et sous tension élevée : 1 000 volts (15 V/cm). La figure 26 présente schématiquement le résultat de deux examens ; les taches résultent de la coloration par la ninhydrine ; aucune tache n'apparaît par pulvérisation du phtalate d'aniline ou du réactif d'Ehrlich. Il n'y a pas de glucide libre parmi les produits solubles de la réaction. On voit que le surnageant est complexe ; il contient au moins 3 constituants ; cependant il est probablement moins complexe que les substances précédentes (F, H, I). Le caséino-glycopeptide est le composant dominant ; il est le seul qui migre vers l'anode à pH 6,5 ; il tend à donner des taches diffuses. Deux composants ont une charge nette positive. Sur la ligne neutre se trouve une tache comme celle que donne la paracaséine α .

III. — Chromatographie

a. — Le caséino-glycopeptide ne migre pas, au cours de la *chromatographie sur papier*, avec les solvants habituels : butanol-acide acétique-eau, butanol-acide formique-eau, phénol-eau. Avec les substances C₁ et C₂ on n'observe que la tache au point de départ, après coloration par la ninhydrine.

Avec le NPN (12 p. 100) non dialysé (substance A) on observe en outre une tache irrégulière, suivie d'une traînée, faiblement colorée par la ninhydrine (R_f 0,30 avec butanol-acide acétique-eau). Les réactifs des sucres et de l'acide neuraminique ne font apparaître aucune tache.

Les substances qui se sont montrées très hétérogènes au cours de l'électrophorèse : NPN (2 p. 100) et protéose dialysées, contiennent plusieurs composants qui se

déplacent sur le papier au cours de la chromatographie. Après coloration à la ninhydrine on observe en général 3 taches dont les R_f moyens, avec le solvant précédent, sont voisins de 0,30, 0,40 et 0,50 en dehors de la tache correspondant au caséino-glycopeptide. Avec le NPN (2 p. 100) non dialysé (substance F) une autre tache faiblement colorée apparaît (R_f 0,7).

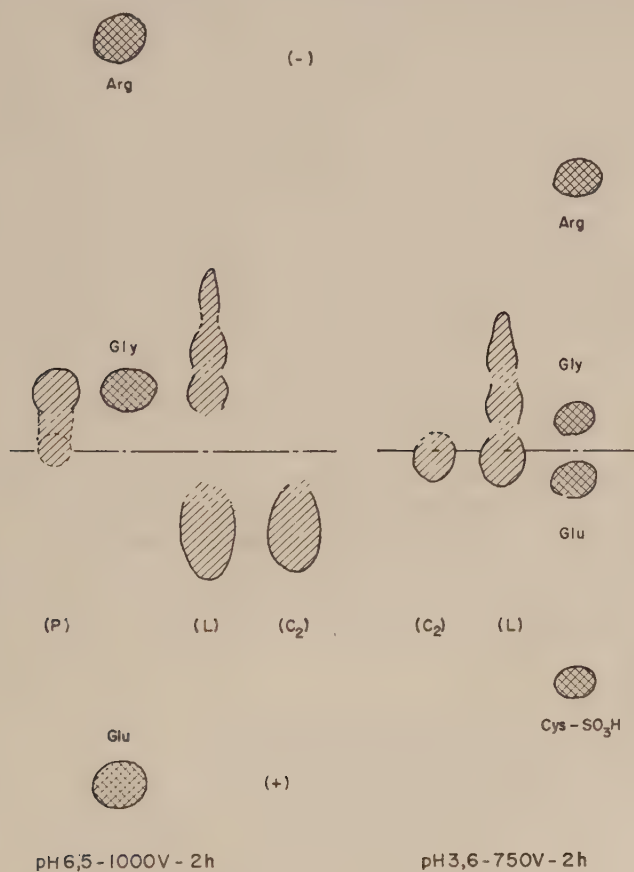


FIG. 26. — Électrophorèse sur papier

(C₂) caséino-glycopeptide de caséine α ;

(L) surnageant de la coagulation ;

(P) paracaseine α .

On remarque que la chromatographie sur papier révèle moins de constituants que l'électrophorèse ; mais il peut se trouver au point de départ un ou plusieurs constituants, avec le caséino-glycopeptide.

b. — Un essai préliminaire de *filtration sur Séphadex G 50*, dans le but de vérifier la pureté du caséino-glycopeptide ; a montré que 4 pics apparaissent au cours de l'élution par l'acide acétique N ; le premier forme plus de 80 p. 100 de l'ensemble. Dans la substance correspondant à chacun de ces pics se retrouvent les mêmes acides aminés. Il s'agit probablement d'associations moléculaires du caséino-glycopeptide formant des polymères.

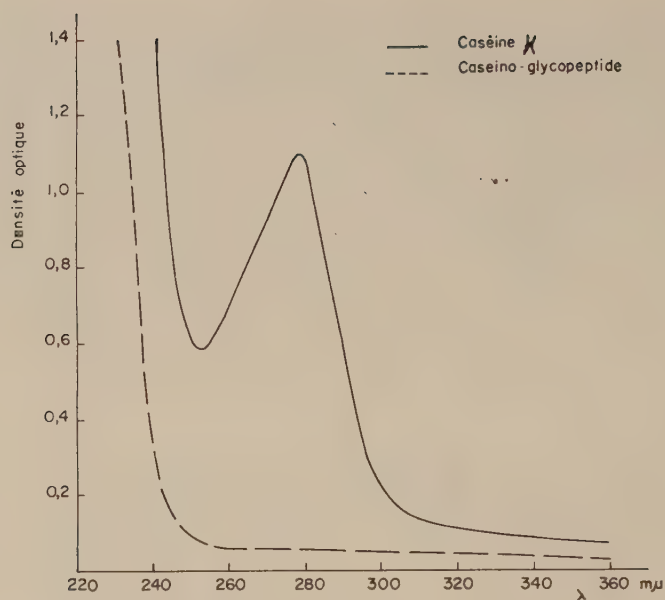


FIG. 27. — Spectre d'absorption dans l'ultraviolet du caséino-glycopeptide et de la caséine κ
 c : 1 mg/ml ;
 cuvette de 1 cm ;
 spectrophotomètre enregistreur CARY-14.

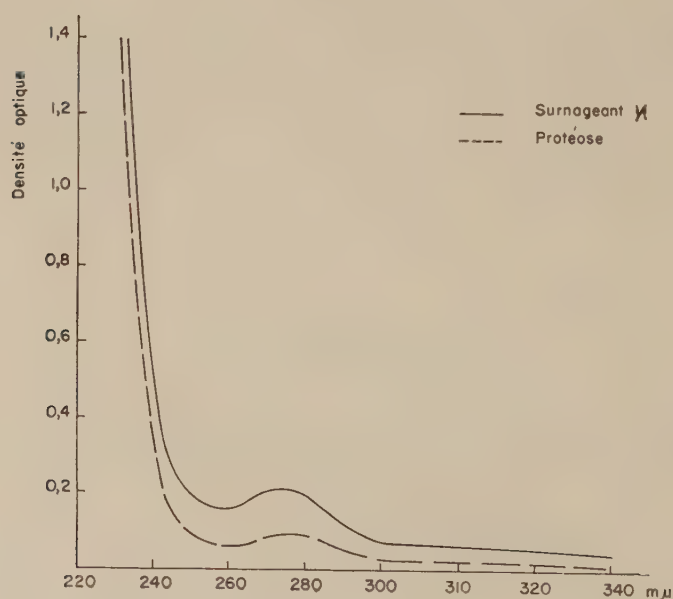


FIG. 28. — Spectre d'absorption dans l'ultraviolet du surnageant de la coagulation (de la caséine)
 et de la protéose isoélectrique
 c : 1 mg/ml ;
 cuvette de 1 cm ;
 spectrophotomètre enregistreur CARY-14.

IV. — Spectre d'absorption dans l'ultraviolet

Les substances extraites des filtrats à 12 p. 100 de TCA, donnent des spectres identiques, quelle que soit la caséine dont elles proviennent. Ces spectres ne présentent pas de pic caractéristique. La figure 27 montre le spectre du caséino-glycopeptide et celui de la caséine α dont il provient, à la même concentration en protéine : 1 mg/ml, à pH 6,85.

Les substances plus complexes : NPN (2 p. 100), protéose et surnageant de la caséine α précipitée par la présure, donnent des spectres présentant un pic vers 275 m μ , longueur d'onde de l'absorption due à la tyrosine ou au tryptophane, au pH considéré. La figure 28 montre les spectres de deux de ces substances, à la même concentration : 1 mg/ml.

Ces substances renferment donc (à côté du caséino-glycopeptide) un ou plusieurs composés azotés contenant des acides aminés aromatiques. La réaction de caractérisation du tryptophane, avec le para-diméthylaminobenzaldéhyde, est d'ailleurs positive avec ces substances.

V. — Solubilité

Le NPN (12 p. 100) est soluble dans l'eau et il reste en solution si l'on abaisse le pH. Par contre le NPN (2 p. 100) se dissout plus difficilement que le précédent en milieu neutre et la solution forme un précipité floconneux vers pH 4,6. Le NPN (2 p. 100) contient donc un constituant insoluble dans une zone de pH où se trouve le point isoélectrique de la caséine. La protéose obtenue à pH 4,6 ne contient pas ce constituant. Ces deux dernières substances ne sont donc pas identiques.

VI. — Teneur en azote et en phosphore

Le tableau 13 présente les résultats de déterminations de l'azote et du phosphore dans les substances obtenues par lyophilisation des filtrats dialysés, ainsi que dans les caséines correspondantes.

La teneur en azote du caséino-glycopeptide est voisine de 11 p. 100 ; elle est très au-dessous de celle de la caséine originelle. On doit donc s'attendre à trouver dans ces substances une partie non peptidique en proportion relativement importante.

Dans les autres produits de la réaction : NPN (2 p. 100), protéose, la teneur en azote est un peu plus forte que dans le caséino-glycopeptide ; elle reste cependant inférieure à celle de la caséine.

La teneur en phosphore est plus variable. Dans les caséino-glycopeptides de vache, elle oscille autour de 0,42 ; elle est donc plus élevée que dans la caséine α (0,2 p. 100). Les caséino-glycopeptides de brebis et de chèvre contiennent plus de phosphore que ceux de vache alors que les caséines correspondantes ont approximativement la même teneur en phosphore.

Nous avons précédemment comparé à plusieurs reprises le NPN (2 p. 100) et la protéose (pH 4,6), en raison de leurs ressemblances. On remarque que la teneur en phosphore est différente dans ces 2 substances, respectivement 0,50 et 0,58.

TABLEAU 13

Teneur en azote et en phosphore. Proportion des produits de la réaction
(Valeurs moyennes concernant les produits purifiés par dialyse)

	Produits de la réaction		Caséine α correspondante (N %)	Proportion p. 100 de la caséine des produits de la réaction	
	N %	P %		en N	en substance sèche
1) NPN (12 %) (caséino-glycopeptide)					
de caséine de vache :					
caséine entière ...	11,3	0,42	14,8	1,70	2,2
caséine α	10,8	0,47	14,8	1,05	1,5
caséine κ	10,1	0,37	13,5	9,00	12,0
de caséine de brebis .	11,4	0,65	14,9	3,65	4,8
de caséine de chèvre .	11,4	0,72	14,7	1,80	2,3
2) NPN (2 %) (*)	13,4	0,50	14,8	4,20	4,6
3) Protéose (après coagulation) (*)	—	0,67	—	—	—
4) Protéose à pH 4,6 (*) ..	12,5	0,58	14,8	4,17	5,0

(*) Provenant de la caséine entière de vache.

VII. — Proportion du caséino-glycopeptide

Le caséino-glycopeptide forme environ 95 p. 100 des substances azotées solubles dans TCA à 12 p. 100 après l'action de la présure, dans les conditions où la réaction primaire apparaît seule.

La proportion du caséino-glycopeptide et des autres produits de la réaction peut être calculée d'après les données du tableau 13 : teneur en azote du produit de la réaction et de la caséine originelle, proportion d'azote de la caséine passée dans le filtrat et ne dialysant pas (les substances dialysables sont exclues de ces calculs ; nous avons vu précédemment qu'elles représentent de 3 à 14 p. 100 du total azoté, selon le mode de déprotéinisation).

D'après les résultats obtenus pour la caséine entière de vache on voit que le NPN (2 p. 100) et la protéose (à pH 4,6) dialysés représentent 4,6 et 5,0 p. 100 de la caséine, soit approximativement deux fois plus que le caséino-glycopeptide. Cette observation confirme celle qui a été faite au sujet des examens électrophorétiques. Nous avons d'ailleurs préparé le caséino-glycopeptide en passant par le NPN (2 p. 100) et en reprecipitant ce dernier par TCA à 12 p. 100 ; le rendement a été de 45,4 et 49,2 p. 100. Compte tenu des pertes survenant au cours des opérations, on peut conclure que le caséino-glycopeptide constitue plus de la moitié des substances solubles complexes : NPN (2 p. 100) et protéose.

En ce qui concerne la caséine κ , le caséino-glycopeptide contenu dans le filtrat à 12 p. 100 de T C A représente 12 p. 100 de la caséine originelle. La paracaséine κ qui précipite (sans addition de TCA) représente environ 75 p. 100 de la caséine κ le surnageant représente donc environ 25 p. 100, soit le double de la proportion du caséino-glycopeptide.

Les proportions données ci-dessus pour le caséino-glycopeptide sont des *minima*, du fait de l'adsorption des substances solubles sur le précipité, lorsque l'on utilise le TCA à 12 p. 100 (chapitre VIII).

Nous avons calculé au chapitre précédent, d'après la proportion d'azote non protéique formé, que la caséine entière doit contenir 19 p. 100 de caséine κ ; on retrouve la même proportion en faisant le calcul d'après la substance sèche. Si les caséines entières de brebis et de chèvre contenaient le même composant sensible à l'action de la présure que la caséine de vache, on calculerait que la caséine de brebis contiendrait 40 p. 100, et la caséine de chèvre 20 p. 100 de caséine κ .

VIII. — Le « NPN-O » et la dénaturation de la caséine κ par l'acide trichloracétique

Nous avons dit au début de ce chapitre, que la faible perte de N au cours de la dialyse du NPN est proportionnelle à la quantité de substances solubles dans TCA, provenant de la caséine, avant l'action de la présure, et que nous avons appelées « NPN-O ».

Afin de préciser la signification du NPN-O, nous avons fait les expériences suivantes, avec la caséine κ :

a) Une solution à 2,14 p. 100 de caséine κ est additionnée d'un égal volume de TCA à 24 p. 100 (concentration finale 12 p. 100). Le filtrat contient 0,0115 mg N/ml, ce qui représente 0,78 p. 100 de N-caséine.

b) La dialyse de ce filtrat, dans les conditions de la préparation du caséino-glycopeptide, montre que 27,4 p. 100 des substances azotées restent dans le sac de dialyse. Les 3/4 environ de ces substances sont donc éliminées. La partie non dialysable représente 0,214 p. 100 de N-caséine.

c) Le précipité de caséine, obtenu dans la première opération, est lavé puis amené à pH 6,8 et dialysé. On obtient une solution contenant 2 p. 100 de caséine κ dénaturée par TCA. Une partie de cette solution, précipitée à nouveau par TCA à 12 p. 100, donne un filtrat dont le contenu en N représente 0,59 p. 100 de N-caséine. Une autre partie, soumise à l'action de la présure, se comporte comme la caséine originelle : elle donne un coagulum et le filtrat trichloracétique, obtenu après 40 mn d'action de la présure (0,03 UP/ml) contient 8,43 p. 100 de N-caséine, (la solution initiale donnait, dans les mêmes conditions 8,75 p. 100).

La dénaturation de la caséine par TCA ne modifie donc pas ses propriétés, en ce qui concerne la réaction de la présure.

Le NPN-O non dialysable représente 2,4 p. 100 du caséino-glycopeptide, c'est-à-dire moins que le composant électrophorétique le moins mobile dans les substances A et B étudiées précédemment. Nous avons supposé que le NPN-O se forme aussi bien après qu'avant l'action de la présure ; mais nous n'en avons pas de preuve.

CHAPITRE X

ÉTUDE DE L'HOMOGENÉITÉ DU CASÉINO-GLYCOPEPTIDE

I. — Critères de pureté

A. — ÉLECTROPHORÈSE

Nous avons vu au chapitre précédent que le caséino-glycopeptide ne donne qu'un constituant électrophorétique dans les conditions suivantes :

— électrophorèse en milieu liquide à pH 8,6 en tampon véronal (mobilité 6,0-6,2) ;

— électrophorèse sur papier à 1 000 volts, à pH 3,6 et à pH 6,5. Le caséino-glycopeptide migre vers l'anode à pH 6,5. A pH 3,6 il se déplace très peu, moins que l'acide glutamique. Son point isoélectrique doit être un peu supérieur à 4.

Observation.

Les méthodes d'électrophorèse en gel (amidon, gélose) ne conviennent pas à l'examen du caséino-glycopeptide. Au cours du traitement du gel, après la migration, la substance se disperse. Plusieurs essais de modification des bains de fixation et de coloration n'ont pas donné de résultat.

B. — CHROMATOGRAPHIE

1) Dans la chromatographie sur papier, le caséino-glycopeptide ne donne qu'une tache au point de départ.

2) La chromatographie du caséino-glycopeptide sur colonnes de résines échangeurs d'ions a donné des résultats surprenants. Plusieurs fractions ont été obtenues, mais on ne peut les considérer comme les constituants d'une substance hétérogène ; leur apparition est consécutive à des modifications provoquées par la technique utilisée. Les résultats de cette étude sont rapportés dans les paragraphes qui suivent.

C. — ULTRACENTRIFUGATION

1) Une étude du comportement du caséino-glycopeptide issu de la caséine α , au cours de l'ultracentrifugation à différentes valeurs de pH, a été effectuée au

Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, grâce à l'obligeance de M^{lle} S. GUINAND, que nous remercions ⁽¹⁾.

A pH 8,6 et à pH 4, le caséino-glycopeptide donne deux pics, dont l'un correspond à un constituant se déposant rapidement.

Le caséino-glycopeptide, préalablement passé sur Séphadex G 50, comme il a été dit au chapitre précédent, donne un pic unique, bien défini (fig. 29). Ce résultat est en faveur de l'homogénéité de la substance examinée. Rappelons qu'il représente plus de 80 p. 100 du caséino-glycopeptide passé sur Séphadex et que le reste, réparti en trois petites fractions, contient les mêmes acides aminés que la fraction principale. Il est donc probable que la filtration sur Séphadex a permis d'éliminer des polymères.

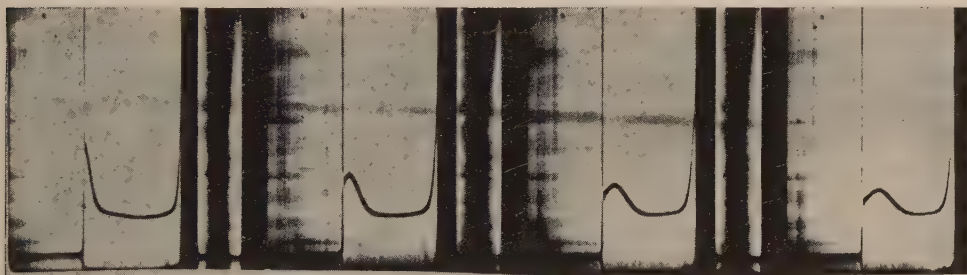


FIG. 29. — Diagramme d'ultra-centrifugation du caséino-glycopeptide temps (après avoir atteint la pleine vitesse) : 12, 44, 76, 110 minutes.

Le coefficient de sédimentation doit être voisin de 1. Il n'a pas encore pu être déterminé avec précision. Un examen, avec une frontière préformée, serait nécessaire pour avoir une valeur plus sûre.

2) Une de nos préparations de caséino-glycopeptide, issu de la caséine entière de vache, a été étudiée à Berne par le professeur NITSCHMANN. Les observations suivantes ont été faites au cours des examens par ultracentrifugation et par diffusion : le caséino-glycopeptide donne un seul pic symétrique dans le diagramme de sédimentation ; il se trouve sous une forme monodispersée (à partir d'une solution à 1,5 p. 100 de caséino-glycopeptide à pH 8,3, les valeurs suivantes ont été calculées : $S_{20} = 1,04 \times 10^{-13}$ et $D_{20} = 10,3 \times 10^{-7}$; le poids moléculaire doit être compris entre 6 000 et 8 000) (120).

II. — Chromatographie sur résines échangeurs de cations

A. — AMBERLITE XE — 64 (IRC 50)

Nous avons tout d'abord fait six essais préliminaires avec cette résine, qui a été largement utilisée dans l'étude de substances peptidiques ayant une assez grosse molécule (voir en particulier la référence (92). Nous avons passé sur des

(1) Examens effectués au Centre d'Ultracentrifugation du C. N. R. S.

colonnes d'Amberlite XE-64, de dimensions $24 \times 1,2$ cm, 5 mg de trois préparations de caséino-glycopeptide, dont deux provenaient de la caséine α et une de la caséine entière de vache. Dans aucune expérience la substance n'a été retenue par la résine ; elle est sortie au début de l'élution par des solutions tampons de différents pH (5,5 à 6,5) et de différentes molarités (0,1 à 0,2 M).

B. — DOWEX 50-X2

Les mêmes préparations de caséino-glycopeptide que ci-dessus ont été passées sur des colonnes de Dowex 50-X2, dans les conditions décrites au chapitre V. Nous avons obtenu une séparation en plusieurs fractions. Les proportions relatives de ces fractions dépendent beaucoup des conditions expérimentales. Dans certains cas, une ou plusieurs fractions n'apparaissent pas.

La figure 30 présente le diagramme d'une chromatographie du caséino-glycopeptide provenant de la caséine α , sur une grande colonne ($105 \times 1,9$ cm), ayant donné la meilleure séparation entre les deux premiers pics A et B (ils sont parfois à demi confondus). Les fractions suivantes ont été séparées (121) :

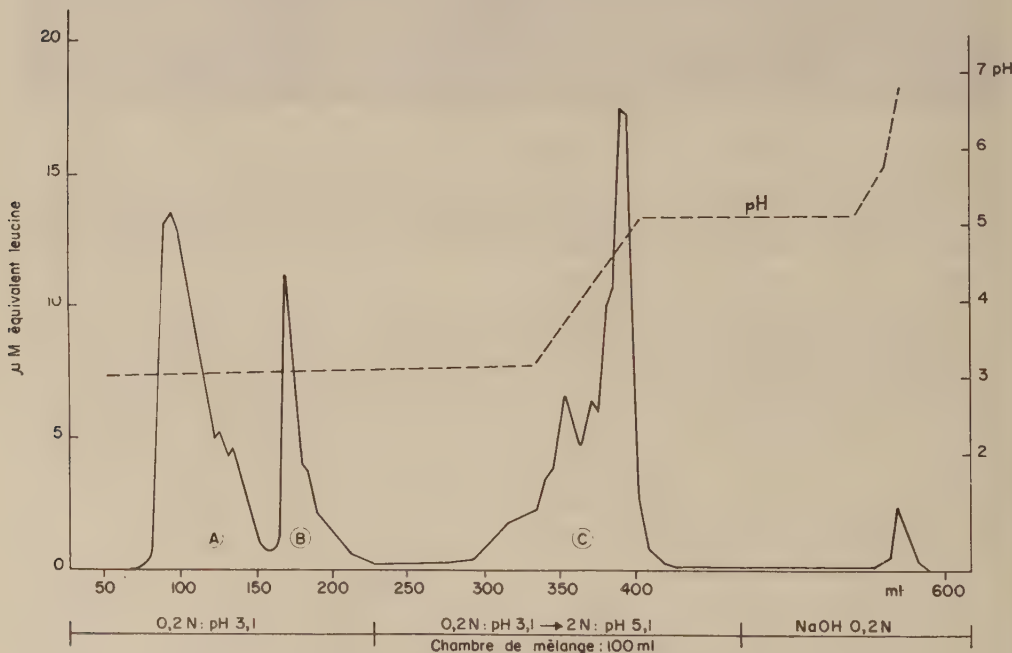


FIG. 30. — Chromatographie du caséino-glycopeptide sur colonne de Dowex 50-X2

125 mg de caséino-glycopeptide (de caséine α) ;
Colonne de $105 \times 1,9$ cm ; 35°C ; fractions de 5 ml ;
Coloration ninhydrine, après hydrolyse alcaline, en équivalent leucine.

— fraction A : apparaît au début de l'élution par la première solution tampon 0,2 M pH 3,1 ; elle n'a pas été retenue par la résine ; elle représente environ 40 p. 100 de la substance mise sur la colonne.

— fraction B : suit la précédente dans la même solution tampon ; le pic est en général presque symétrique ; il représente environ 15 p. 100 de la substance ;

— fraction C : apparaît dans le gradient d'élution, de 0,2 M pH 3,1 à 2 M pH 5,1, alors que se produit une rapide élévation du pH. Le pic a une forme irrégulière ; il n'a pas été possible de le résoudre en deux parties en modifiant la marche de l'élution : plus grande chambre de mélange, plus faible volume des fractions. Cette fraction représente environ 45 p. 100 de la substance.

Un nouveau gradient de pH 5,1 à 6,6 et une élévation de la température de 35 à 50°C n'ont provoqué aucune élution de substance azotée. Par contre, un petit pic est apparu dans NaOH 0,2 M. Il est à noter que la quantité d'équivalent leucine qu'il représente, additionnée aux 3 autres, donne un total correspondant à plus de 100 p. 100 de la substance, dans presque toutes les expériences.

III. — Contrôle de la pureté des fractions A, B et C

1) FRACTION A

Cette fraction n'a pu être complètement dessalifiée, ni sur colonne de Dowex II, ni sur colonne de Dowex 50, même en employant de grandes quantités de résine, dans les conditions décrites au chapitre V. Sur la première résine 60 p. 100 de la substance ne sont pas élués, sur la deuxième, 85 p. 100. Finalement cette fraction a été dessalifiée par dialyse contre l'eau ; on retrouve 85 p. 100 de la substance à l'intérieur du sac de dialyse.

La fraction A dialysée a été passée à nouveau sur une colonne de Dowex 50-X2, comme le caséino-glycopeptide ; on a obtenu un fractionnement comparable, mais avec des proportions différentes :

A₁ (début d'élution) : 50 p. 100

B₁ (0,2 M-pH 3,1) : 6 p. 100

C₁ (gradient 0,2 M pH 3,1/2 M pH 5,1) : 45 p. 100.

La fraction A paraît donc être complexe, mais il faut noter deux particularités :

— elle donne à nouveau les 3 pics obtenus au cours de la chromatographie initiale ;

— elle se forme, même lorsque la quantité de caséino-glycopeptide chargée sur la colonne est faible par rapport au volume de résine ; dans l'expérience, représentée sur la figure 30, nous avons mis 125 mg de substance sur la colonne de 105 × 1,9 cm ; dans une autre expérience nous n'en avons mis que 46 mg et le même résultat été obtenu dans les deux cas.

2) FRACTION B

Elle a pu être dessalifiée sur Dowex 50 ; elle a ensuite été repassée sur une colonne de Dowex 50-X2, dans les conditions initiales.

Un pic symétrique : B₁, représentant 95 p. 100 de la substance chargée sur la colonne, a été obtenu au même niveau que B.

La fraction B₁ a été dessalifiée puis soumise à l'électrophorèse sur papier à pH 3,6 et à pH 6,5 ; une seule substance a pu être repérée.

3) FRACTION C

Au cours de la dessalification sur Dowex 50, seulement 60 p. 100 de cette fraction sont retenus ; on a ainsi la fraction dessalifiée C_1 . En la passant à nouveau sur la colonne de Dowex 50-X2, dans les conditions initiales, on reproduit approximativement la première chromatographie, avec des proportions différentes :

C_{1-a} (début d'élution) : 8 p. 100

C_{1-b} (0,2 M pH 3,1) : 40 p. 100

C_{1-c} (gradient 0,1 M pH 3,1/2 M pH 5,1) : 40 p. 100.

La sous-fraction C_{1-c} a été dessalifiée et rechromatographiée comme précédemment ; on a obtenu 2 pics, aux niveaux b et c , représentant 40 et 60 p. 100 de la substance chargée sur la colonne.

La fraction C se comporte donc comme la fraction A.

IV. — Chromatographie sur résine échangeur d'anions

Nous avons appliqué la méthode d'élution par palier, décrite au chapitre V, avec la résine Dowex II-X8, en utilisant trois solutions tampons différentes ; tris-

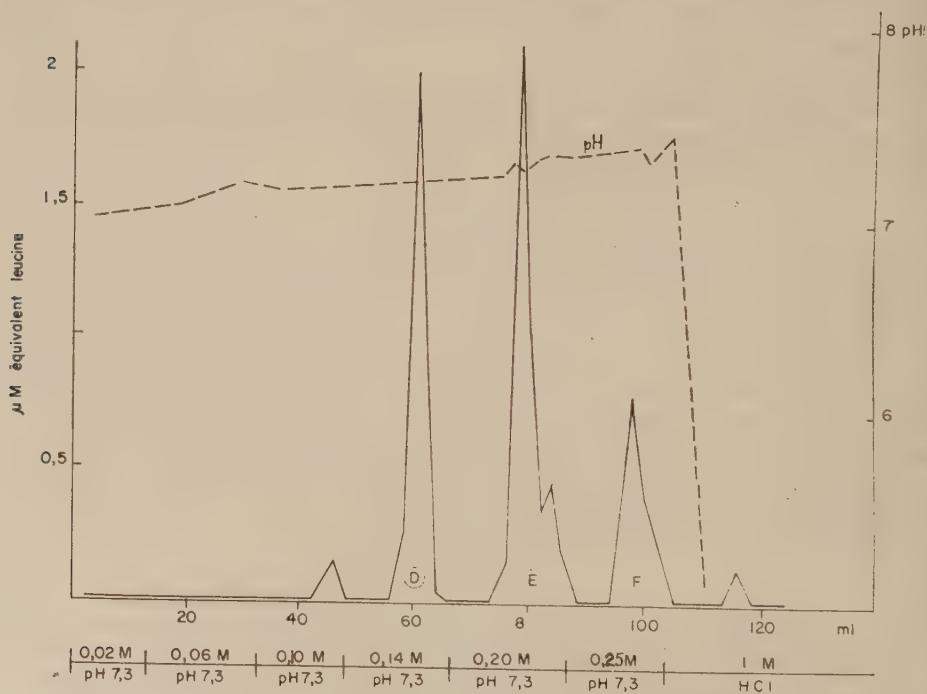


FIG. 31. — Chromatographie du caséino-glycopeptide sur colonne de Dowex II-X8

5 mg de caséino-glycopeptide (de caséine α) ;
colonne de $24 \times 1,2$ cm ; 20°C ; fraction de 2 ml.

Coloration ninhydrine, après hydrolyse alcaline, en équivalent leucine.

hydroxyméthylamino-méthane (THAM) à pH 7,0 ; cacodylate à pH 6,7 et acétate à pH 5. Plusieurs fractions sont apparues, à 4 ou 5 paliers, dans chaque chromatographie.

La chromatographie a été faite soit au laboratoire, à 20°C, soit à la chambre froide, à + 2°C. L'effet de la température est négligeable.

La figure 31 montre le résultat d'une de ces chromatographies. Les fractions D et E ont été dessalifiées et repassées sur la colonne de Dowex II-X8, en éluant avec des solutions tampons de THAM à des molarités légèrement différentes 0,12 — 0,15 — 0,22 — 0,30 M. Nous avons obtenu dans chaque cas une nouvelle division en 3 pics à 0,12 — 0,15 et 0,22 M.

Nous avons également passé sur cette résine la fraction A, issue de la chromatographie sur colonne de Dowex 50-X2 ; au cours de l'élution avec la solution tampon de THAM trois pics ont été obtenus à 0,08-0,16 et 0,25 M.

L'élution par déplacement, avec une solution tampon de molarité élevée : THAM 0,5 M, ne donne pas de séparation ; la substance est éluee au commencement de l'opération.

V. — Composition des fractions A, B et C de la chromatographie sur Dowex 50-X2

La composition en acides aminés des fractions A et B, la teneur en phosphore et en glucides des fractions A, B et C ont été déterminées en même temps que celles des caséino-glycopeptides dont proviennent ces fractions. Les résultats seront donnés ensemble au chapitre suivant (tableaux 15 et 17).

Trois de ces résultats sont particulièrement significatifs :

- les fractions A, B et C ne contiennent pas de phosphore (le caséino-glycopeptide en contient en moyenne 0,4 p. 100) ;
- les fractions B et C contiennent les mêmes acides aminés que le caséino-glycopeptide et en proportions très voisines ;
- les fractions A, B et C contiennent les mêmes glucides que le caséino-glycopeptide, mais en plus faibles quantités ; les proportions des trois composants glucidiques dosés varient d'une fraction à l'autre.

On peut conclure de ces résultats que le fractionnement constaté est la conséquence des conditions expérimentales de la chromatographie. Le passage sur résine s'accompagne de la coupure des liaisons ester phosphorique et de liaisons entre les sucres et la partie peptidique ; il en résulte une modification de la charge. Le comportement chromatographique différent est sans doute dû à la partie non peptidique.

D'autre part la présence de Brij-35 dans les solutions tampons utilisées dans la chromatographie sur Dowex 50-X2 a peut-être provoqué la formation de composants chromatographiques artificiels (un tel phénomène a été observé (122) avec des protéines du sérum sanguin, en présence d'acides gras et d'autres petites molécules).

Ces observations, venant après celles que nous avons exposées au début de ce chapitre, nous portent à considérer le caséino-glycopeptide comme une substance homogène et à penser que les fractions (A, B et C) ne sont pas des constituants existant avant la chromatographie, mais qu'elles représentent des stades différents de la dégradation d'une même molécule.

CHAPITRE XI

COMPOSITION DU CASÉINO-GLYCOPEPTIDE ET DE LA PARACASÉINE KAPPA

I. — Composition en acides aminés des caséino-glycopeptides de vache, brebis et chèvre

Les résultats des analyses, selon la méthode de MOORE et coll. (101) décrite au chapitre VI, sont rassemblés dans le tableau 14 (123), (124). Ils sont exprimés en p. 100 de la partie peptidique et en rapports moléculaires, en prenant pour unité Gly et Leu, dans le cas du caséino-glycopeptide de vache, et His dans le cas de ceux de brebis et de chèvre. Il a été tenu compte de la destruction subie par certains acides aminés au cours de l'hydrolyse.

TABLEAU 14

Composition en acides aminés des caséino-glycopeptides (124)
% de la partie peptidique ; r, rapport moléculaire

Acide aminé	Vache		Brebis		Chèvre	
	Caséine entière, α et κ		Caséine entière		Caséine entière	
	%	r	%	r	%	r
Asp.....	8,15	4	12,0	8	11,5	7
Thr.....	16,1	9	11,5	8-9	14,75	10
Ser.....	9,8	6	10,6	7-8	8,2	6
Glu.....	19,8	9	18,0	10	17,55	9
Pro.....	11,15	7	10,7	7	10,6	7
Gly.....	1,2	1	0	0	0	0
Ala.....	6,5	5	12,0	10	11,5	10
Val.....	8,35	5	7,2	5	8,1	5
Ileu.....	9,7	5	8,7	5-6	8,7	5
Leu.....	2,1	1	0,8	0,5	0	0
Lys.....	6,4	3	4,95	3	6,05	3
His.....	0	0	1,3	1	2,05	1
Inconnu.....	0,75	1	0	0	0	0

Les résultats concernant le caséino-glycopeptide de vache représentent la moyenne de 6 analyses distinctes portant sur trois préparations provenant l'une de la caséine entière, la seconde de la caséine α et la troisième de la caséine κ . La comparaison des résultats individuels nous a fait conclure à l'identité de la partie peptidique, étant donné que ces résultats sont très proches ; les écarts ne sont pas significatifs, dans l'ensemble. La caséine κ est la plus pure des trois caséines étudiées ; tout se passe comme si elle constituait la source unique du caséino-glycopeptide.

Les caséino-glycopeptides de brebis et de chèvre ressemblent beaucoup à celui de vache.

On peut faire les constatations suivantes :

a) Une partie seulement des 18 acides aminés de la caséine se retrouve dans le caséino-glycopeptide correspondant. On en trouve 10 dans les caséino-glycopeptides de brebis et de chèvre et 11 dans celui de vache. Dans ce dernier il existe en outre une substance non encore déterminée, présente en faible quantité, se trouvant dans le groupe des acides aminés basiques.

b) Tous les caséino-glycopeptides ont en commun 9 acides aminés :

Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Ala, Val, Ileu, Lys.

Celui de vache contient en plus : Leu et Gly ; ceux de brebis et de chèvre contiennent His.

c) Deux groupes d'acides aminés sont absents dans les caséino-glycopeptides, alors qu'ils sont bien représentés dans les caséines :

— les acides aminés aromatiques : Phe, Tyr, Try (ce qui explique l'absence de pic vers 280 $m\mu$ dans le spectre d'adsorption en UV) ;

— les acides aminés soufrés : Met, Cys.

De plus l'arginine est absente.

d) Les hydroxyaminoacides (Ser, Thr) forment une part importante de la partie peptidique des caséino-glycopeptides ; plus du 1/4 dans ceux de vache et de chèvre, plus du 1/5 dans celui de brebis. Une proportion aussi élevée de groupes OH lyophiles peut expliquer, en partie, la grande solubilité du caséino-glycopeptide.

e) Les acides aminés basiques sont relativement peu abondants ; il y a 3 groupes basiques (Lys) pour 13 groupes acides (Asp, Glu) ; ces derniers peuvent être partiellement sous forme amidée. Le nombre de résidus d'ammoniac n'est pas mesuré avec précision ; il y en a environ 7. On sait que les hydroxyaminoacides produisent NH_3 au cours de l'hydrolyse ; d'autre part l'acide sialique perd sous forme de NH_3 environ la moitié de son azote (125). Il y a probablement moins de 5 résidus d'ammoniaque sous forme amide. Il resterait donc plusieurs groupes carboxyliques libres. Le caséino-glycopeptide, comme la caséine κ , a un caractère acide (il contient en outre un résidu d'acide phosphorique et plusieurs résidus d'acide sialique comme nous le verrons plus loin).

f) Alors que la caséine κ contient Ileu et Leu en proportions égales, le caséino-glycopeptide correspondant contient ces deux acides aminés dans le rapport 5/1 ; la leucine est d'ailleurs absente dans le caséino-glycopeptide de chèvre.

La présure détache donc de la caséine un peptide dont la composition en acides aminés est très différente de celle de la caséine originelle.

II. — Composition en acides aminés des fractions chromatographiques B et C et du caséino-glycopeptide dont elles proviennent

Les résultats de l'analyse comparative de ces trois substances sont présentés dans le tableau 15 (121). Les fractions séparées sur colonne de Dowex 50-X2 (chapitre précédent) ont la même partie peptidique que le caséino-glycopeptide de caséine α qui a été chromatographié. Ces fractions ne peuvent donc se différencier que par la partie non-peptidique.

TABLEAU 15

Composition en acides aminés du caséino-glycopeptide et des fractions chromatographiques (121)
(en % de la partie peptidique)

Acide aminé	Caséino-glycopeptide	Fraction B	Fraction C
Asp	10,3	9,6	10,7
Thr	14,6	14,7	15,5
Ser	8,5	8,1	8,1
Glu.....	18,4	19,1	17,5
Pro.....	12,8	12,2	11,1
Gly.....	0,5	0,9	1,0
Ala	5,8	7,8	7,8
Val	9,2	7,8	9,2
Ileu	10,0	9,9	9,7
Leu	2,8	2,7	2,4
Lys	6,6	7,2	6,9
Total.....	99,5	100,0	99,9

III. — Composition de la partie non peptidique des caséino-glycopeptides

La teneur en phosphore des caséino-glycopeptides a été donnée précédemment (tableau 13), avec celle des autres produits de la réaction.

TABLEAU 16

Composition glucidique des caséino-glycopeptides (77)
g de résidu p. 100 g. de substance sèche
(p. 100 des glucides totaux)

Caséino-glycopeptide	Osamine (*)	Ose	Acide sialique (**)	Glucides totaux
<i>de caséine de vache</i>				
entière.....	5,7 (28)	6,9 (34)	7,8 (38)	20,4
α	4,1 (30)	4,7 (35)	4,7 (35)	13,5
κ	7,9 (28)	6,7 (24)	13,5 (48)	28,1
<i>de caséine de brebis</i>				
entière.....	2,4 (44)	2,1 (38)	1,0 (18)	5,5
<i>de caséine de chèvre</i>				
entière.....	3,2 (33)	3,6 (38)	2,8 (29)	9,6

(*) en acétyl-hexosamine.

(**) en acide N-acétylneuraminique.

La composition en sucre et en glucides azotés est présentée dans le tableau 16. Tous les caséino-glycopeptides sont beaucoup plus riches en glucides que la caséine dont ils proviennent. Cette caractéristique importante de leur composition chimique apporte une autre explication à leur très grande solubilité (la première ayant été mentionnée à propos de la teneur élevée en hydroxyaminoacides). Les caséino-glycopeptides de vache contiennent plus de glucides que ceux de brebis et de chèvre. Le caséino-glycopeptide α contient près de 30 p. 100 de glucides totaux ; la proportion de l'acide sialique est particulièrement grande. On sait que cet acide est relativement fort (pK voisin de 2) ; il contribue à la charge négative du caséino-glycopeptide.

Contrairement à ce que nous avons constaté à propos de la partie peptidique, des différences notables de composition glucidique apparaissent entre les caséino-glycopeptides que nous avons analysés.

En ce qui concerne les caséino-glycopeptides de vache, il est possible que la technique expérimentale ait une influence. Nos préparations ont été faites selon la même méthode (chapitre III) ; mais le temps de contact avec l'acide trichloracétique (qui dépend du volume mis en œuvre et de la vitesse de filtration) et la rapidité de l'élimination de celui-ci peuvent varier. Les résultats présentés plus loin (tableau 17), concernant les fractions chromatographiques, montrent que les glucides ne sont pas très solidement liés entre eux ou à la partie peptidique, qui constitue la base constante.

En ce qui concerne les caséino-glycopeptides provenant des caséines de brebis et de chèvre, les teneurs en glucides, très différentes des précédentes, doivent plutôt être interprétées comme une caractéristique de l'espèce animale envisagée.

IV. — Identification des glucides

Par les méthodes chromatographiques décrites au chapitre IV, nous avons décelé le galactose dans tous les caséino-glycopeptides analysés ; il ne semble pas que d'autres sucres soient présents (fig. 32). Par chromatographie directe on constate la présence d'une osamine, mais sa position est imprécise. Après la réaction de la ninhydrine nous avons repéré le lyxose comme produit d'hydrolyse, ce qui prouve la présence de galactosamine dans le caséino-glycopeptide (fig. 33). La chromatographie sur colonne d'Amberlite C G 120 a permis de confirmer la présence de galactosamine et l'absence de glucosamine (77). La galactosamine se trouve sous la forme acétylée.

L'acide N-acétylneuraminique seul a été mis en évidence dans les caséino-glycopeptides de caséine de vache. Par contre, dans les caséino-glycopeptides de caséines de brebis et de chèvre, un deuxième acide sialique apparaît, à côté du précédent, il s'agit de l'acide N-glycolylneuraminique (fig. 34). Dans celui de chèvre, les deux composants paraissent être présents en proportions égales ; dans celui de brebis, l'acide N-glycolyl domine largement. Il existe donc une différence spécifique en ce qui concerne les acides sialiques.

Il est possible que les caséino-glycopeptides contiennent la forme O-N-acétylée de l'acide neuraminique ; elle est labile et se transforme facilement en forme N acétylée.

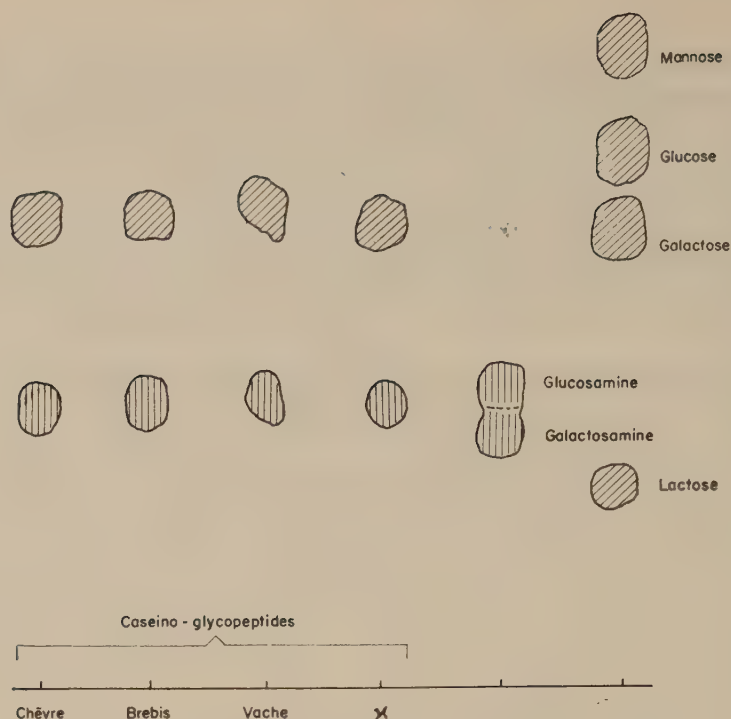


FIG. 32. — Identification des glucides par chromatographie sur papier
 solvant : *n*-butanol-pyridine-eau ;
 papier Whatman n° 1, durée 26 h ;
 révélation par le phtalate d'aniline.

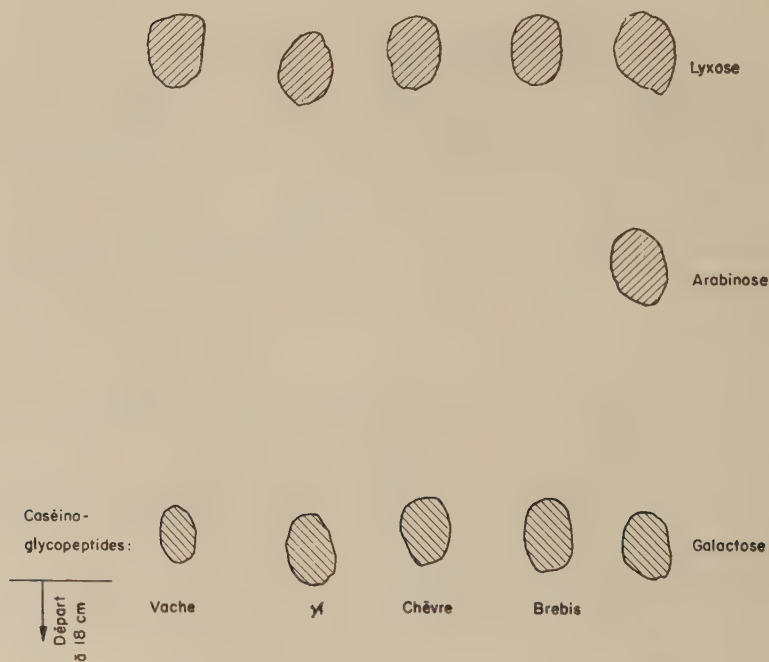


FIG. 33. — Identification des osamines après dégradation par la ninhydrine
 (mêmes conditions que pour la figure 32) ; durée 40 h.

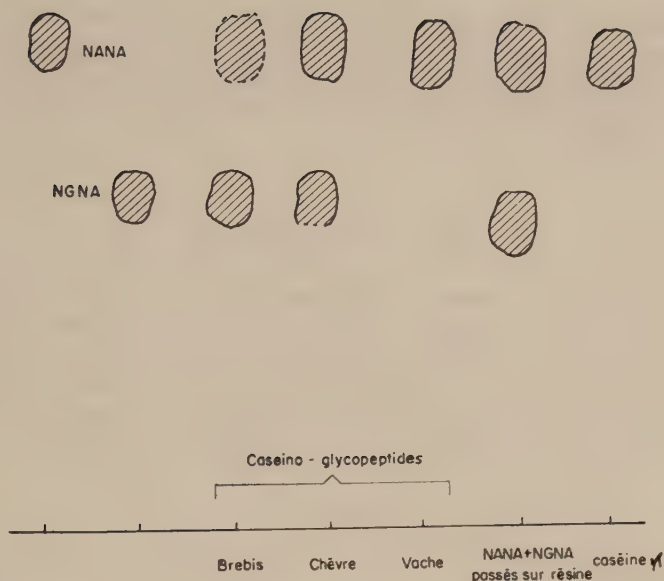


FIG. 34. — Identification des acides sialiques par chromatographie

Solvant : *n*-butanol-*n*-propanol-HCl 0,1 N ;

Papier Whatman n° 1 ; durée 16 h ;

Révélation par le réactif d'Ehrlich ;

NANA : acide N-acétylneuraminique ;

NGNA : acide N-glycolylneuraminique.

V. — Composition de la partie non peptidique des fractions chromatographiques A B et C

Nous avons dosé le phosphore et les glucides dans chacune des 3 fractions provenant du passage sur Dowex 50-X2 du caséino-glycopeptide de caséine entière et du caséino-glycopeptide de caséine α (chapitre X). Les résultats sont présentés dans le tableau 17 (77).

TABLEAU 17

Composition de la partie non peptidique des fractions chromatographiques des caséino-glycopeptides (77)
(% de substance sèche)

	P	Osamine	Ose	Acide sialique	Glucides totaux
(Caséino glycopeptide de caséine entière de vache)					
Fraction A	0	4,2	7,3	5,9	17,4
Fraction B	0	1,8	2,4	1,8	6,0
Fraction C	0	1,3	6,3	—	—
(Caséino-glycopeptide de caséine α de vache)					
Fraction A	0	1,8	5,4	2,5	9,7
Fraction B	0	1,5	3,1	1,7	6,3
Fraction C	0	2,5	4,2	1,9	8,6

Toutes les fractions sont privées de phosphore (le caséino-glycopeptide originel en contient respectivement 0,42 et 0,47 p. 100). Leur teneur en glucides est variable ; le total est, dans tous les cas, nettement inférieur à ce qu'il est dans le caséino-glycopeptide, respectivement 21,0 et 13,8 p. 100. Ces observations ont été discutées au chapitre précédent.

VI. — Bilan analytique

A. — Les valeurs du tableau 14, rapportées à la quantité de substance sèche hydrolysée, permettent de calculer le pourcentage de la partie peptidique.

Le pourcentage de la partie non peptidique est obtenu en additionnant les glucides totaux (tableau 16) au phosphore (tableau 13) exprimé en H_2PO_3 .

Le tableau 18 (77) montre que la somme de ces deux parties n'est jamais égale à 100 ; il reste une partie indosée dont la proportion varie de 8,7 à 25 p. 100.

TABLEAU 18

Caractéristiques analytiques des caséino-glycopeptides (77)

Caséino-glycopeptide	% de substance sèche		
	Partie non peptidique (*)	Partie peptidique	Indosé
<i>de la caséine de vache</i>			
entière.....	22,0	64,5	13,5
α	15,0	60	25,0
κ	29,0	62	9,0
<i>de la caséine de brebis</i>			
entière.....	7,1	82	10,9
<i>de la caséine de chèvre</i>			
entière.....	11,8	79,5	8,7

(*) Glucides totaux + H_2PO_3 .

B. — D'après la composition en acides aminés, en galactosamine et en acide N-acétylneuraminique, on calcule que le caséino-glycopeptide κ doit contenir 9,9 p. 100 d'azote. Nous avons trouvé par dosage direct en moyenne 10,1 (extrêmes : 9,65-10,3), valeur très proche de la précédente.

VII. — Proportion des constituants de la caséine séparés dans le caséino-glycopeptide

On peut calculer ces proportions d'après les tableaux 2 et 16 donnant la composition de la caséine et celle du caséino-glycopeptide et d'après le tableau 13 qui présente les quantités de caséino-glycopeptide produites par les différentes caséines. Le tableau 19 montre les résultats (77).

TABLEAU 19

Pourcentage des constituants de la caséine séparés dans le caséino-glycopeptide (77)

Caséino-glycopeptide	N	P	Galactosamine	Galactose	Acide sialique	Glucides totaux
<i>de caséine de vache</i>						
entière	1,70	0,8	23	33	38	31
α	1,15	1,2	23	30	31	28
κ	9,00	22,0	75	68	77	74
<i>de caséine de brebis</i>						
entière	3,65	2,8	32	26	45	30
<i>de caséine de chèvre</i>						
entière	1,80	1,7	17	19	46	22

C'est dans le caséino-glycopeptide κ que l'on trouve la proportion la plus élevée des composants glucidiques de la caséine dont il provient : de 68 à 77 p. 100. Dans les autres caséino-glycopeptides, cette proportion est bien inférieure à la précédente ; elle varie de 17 à 46 p. 100. C'est une preuve nouvelle que la caséine κ est le substrat de la présure. Si les autres composants de la caséine subissaient l'action de la présure, une plus grande proportion des glucides serait détachée sous forme de caséino-glycopeptide.

Après l'action de la présure il ne reste donc dans la paracaséine κ et éventuellement dans les autres produits de la réaction tout au plus qu'un quart des glucides de la caséine κ . Cette estimation est probablement trop large, car la séparation du caséino-glycopeptide n'est pas complète.

VIII. — Composition de la paracaséine κ

Nous avons vu que la paracaséine κ , précipitée au cours de l'action de la présure sur la caséine κ , représente de 70 à 75 p. 100 en poids de celle-ci. Les résultats de la détermination des acides aminés montrent que tous ceux qui sont absents du caséino-glycopeptide, sauf Cys, se trouvent dans un rapport très voisin dans la paracaséine et dans la caséine κ : Met, Tyr, Phe, His, Arg. Nous avons pris ce rapport comme base de calcul des rapports moléculaires présentés dans le tableau 20 (126).

TABLEAU 20

Composition en acides aminés de la paracaséine κ (126)

% de la partie peptidique
r, rapports moléculaires

	%	r		%	r
Cys, SO ₃ H	1,26	—	Met	0,91	2
Asp	6,94	13	Ileu	5,76	10
Thr.	3,15	7	Leu	6,88	12
Ser.	5,09	13	Tyr.	10,50	13
Glu	17,75	28	Phe	4,97	6
Pro	8,67	17	Lys.	9,80	12
Gly	1,16	4	His	2,76	4
Ala	5,43	14	Arg.	4,76	7
(Cys)	1,07	(4)	Try.		2
Val	4,95	10			

On remarque que la proportion des acides aminés de la paracaséine et celle du caséino-glycopeptide (tableau 14) sont approximativement complémentaires. Avec la plupart des acides aminés, on vérifie la relation : caséino-glycopeptide + paracaséine $\times$ = caséine $\times$. Le rapport Ileu/Leu dans la paracaséine est voisin de celui de la caséine.

Les résultats du dosage des glucides sont présentés dans le tableau 21. On remarque que la teneur en glucides dépend du traitement subi par le précipité de paracaséine. La substance n° 1 du tableau 21 a été seulement lavée à l'eau ; la substance n° 2 a été de plus lavée à l'alcool et à l'éther. La substance n° 3 a été lavée à l'eau, dissoute dans l'acide acétique normal, reprécipitée en élevant le pH à 7,0 et relavée à l'eau ; on a ainsi obtenu 63,4 p. 100 de substance sèche par rapport au poids de caséine mise en œuvre. Cette dernière substance contient moins de glucides que les précédentes ; la purification a été plus poussée, mais elle n'est peut-être pas achevée. L'adsorption de substances solubles sur le précipité, que nous avons déjà mentionnée, paraît malaisée à détruire. La teneur en acide sialique, tombée à 0,55 p. 100 dans la substance n° 3, est compatible avec celle du caséino-glycopeptide ; par contre les teneurs en galactosamine et galactose sont encore trop élevées ; elles représentent respectivement 35 et 36,5 p. 100 des composants de la caséine $\times$, alors que le caséino-glycopeptide en représente 75 et 68 p. 100 à lui seul. Le bilan des glucides n'est donc pas aussi significatif que celui des acides aminés.

TABLEAU 21

Composition de la paracaséine $\times$
(% de la substance sèche)

Paracaséine (*)	N	P	Galactosamine	Galactose	Acide sialique
n° 1	—	—	1,13	1,16	1,27
n° 2	—	—	1,05	0,79	0,80
n° 3	13,2	0,19	0,81	0,80	0,55
Pourcentage des composants de la caséine restant dans l'échantillon n° 3	72,5	70	35	36,5	18

(*) Voir texte.

IX — Composition du NPN-O

Nous avons analysé la substance soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 et non dialysable, obtenue à partir de la caséine $\times$ (sans action de la présure), dont nous avons étudié la formation au chapitre IX. La composition en acides aminés est donnée dans le tableau 22, en p. 100 de substances sèches et en rapports moléculaires, en prenant pour unité (Cys-) et Phe.

Les rapports moléculaires sont très différents de ce qu'ils sont dans la caséine $\times$. Les acides aminés aromatiques sont présents en faible proportion ; il y a deux fois plus de Ileu que de Leu. Le NPN-O paraît avoir une composition en acides aminés intermédiaire entre celle de la caséine et celle du caséino-glycopeptide. On peut

supposer que l'acide trichloracétique détache de la caséine un peptide comparable au caséino-glycopeptide. Ce peptide se trouverait dans le filtrat, à côté d'un peu de paracaséine, qui apporte dans le mélange Cys, Tyr et Phe. Sur cette base on peut déduire de la composition du produit initial ce qui reviendrait à la paracaséine ;

TABLEAU 22

Composition en acides aminés du « NPN-O »
 %, de la substance sèche
 r, rapports moléculaires

	Produit initial		Après déduction de la para- caséine x		Caséino-glyco- peptide x
	%	r	%	r	r
Asp	2,9	9	2,4	3	4
Thr.....	4,8	16	4,6	7	9
Ser.....	4,2	16	3,9	6	6
Glu	10,1	27	8,8	17	9
Pro *	2,0	7	1,4	2	7
Gly	0,6	3	0,5	1	1
Ala	1,3	6	0,9	2	5
(Cys-)	0,3	1	0,2	0,3	0
Val	3,3	11	3,0	4-5	5
Ileu	2,3	7	1,9	3	5
Leu	1,2	4	0,7	1	1
Tyr.....	0,7	1-2	0	0	0
Phe	0,4	1	0	0	0
Lys.....	0,6	1-2	0	0	3
TOTAL	34,7		28,2		

* Pro : résultat provisoire.

on obtient ainsi les valeurs données dans le tableau 22. On retrouve certaines caractéristiques du caséino-glycopeptide, dans les rapports moléculaires que l'on peut établir sur la base Gly = Leu = 1. Les différences portent principalement sur Pro et Glu et sur Lys qui disparaît en même temps que Tyr, Phe, et Cys (en ce qui concerne Pro il s'agit d'une détermination approximative). On remarque que la proportion de la partie peptidique est très faible dans le NPN-O ; elle représente environ 1/3 de la substance sèche.

CHAPITRE XII

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES STRUCTURES. POIDS MOLÉCULAIRES

L'établissement de la structure chimique d'un glycopeptide de la taille de celui que nous avons étudié (P. M. environ 8 000) est une entreprise longue et difficile malgré le perfectionnement des méthodes d'investigation. La structure de la caséine κ sera encore plus difficile à déterminer que celle du caséino-glycopeptide. Nous nous sommes limités à quelques points essentiels, qui font l'objet des paragraphes suivants. Nous terminerons ce chapitre par la présentation de l'ensemble des données acquises et par l'exposé de quelques hypothèses sur la structure du caséino-glycopeptide et sur la place qu'il occupe dans la molécule de caséine κ .

I. — Acides aminés terminaux de la paracaséine κ

1) Aucun acide aminé N-terminal n'a pu être mis en évidence par la méthode de SANGER, ni par celle d'EDMAN dans la paracaséine κ , ni dans la caséine κ (chapitre VII). Il est probable que le groupement aminé terminal est impliqué dans une liaison dont nous ne connaissons pas la nature.

2) Après action de la carboxypeptidase, pendant 3 heures, on a identifié les acides aminés dans les proportions indiquées dans le tableau 23, pour la paracaséine κ et, par comparaison, pour la caséine κ (116).

TABLEAU 23
Acides aminés C-terminaux (116) ()*
(moles pour 10^5 g)

Acides aminés	Paracaséine κ	Acides aminés	Caséine κ	Caséino-glycopeptide
Leu.....	5,1 (1,0)	Val	3,1 (1,0)	12 (1,0)
Phe.....	4,3 (0,85)	Thr	1,9 (0,6)	10 (0,8)
Thr, Ileu.....	2,0 (0,40)	Ala	1,5 (0,5)	5 (0,4)
Val, Tyr.....	1,4 (0,30)	Ser.....	1 (0,3)	4 (0,3)

(*) Après 3 h d'action de la carboxypeptidase.

Les nombres entre parenthèses représentent les rapports moléculaires.

A partir de la caséine κ , la valine et la thréonine sont produites avec un fort rendement ; la valine terminale a probablement été entièrement détachée en 3 heures ; ce n'est peut-être pas le cas de la thréonine, qui est moins bon substrat pour l'enzyme. Ces deux acides aminés peuvent être chacun en position terminale à l'extrémité de deux chaînes ; mais ils peuvent aussi faire partie de la même séquence, avec les deux autres acides aminés produits avec un moins bon rendement. Un résidu terminal de valine correspond à un poids moléculaire de 32 000.

Après l'action de la présure, deux autres acides aminés C-terminaux apparaissent dans la paracaséine κ : leucine et phénylalanine. Ils sont probablement impliqués dans les liaisons que coupe la présure. Le poids moléculaire pour un résidu terminal de leucine est environ de 20 000.

II. — Acides aminés terminaux des caséino-glycopeptides

1) De même que dans la caséine κ et la paracaséine κ , aucun acide aminé N-terminal n'a pu être caractérisé dans les caséino-glycopeptides analysés (on n'a détecté que : ϵ -DNP-Lysine). Avec le caséino-glycopeptide de caséine κ , par la méthode de SANGER, on a pu mettre en évidence deux dérivés jaunes, par chromatographie sur papier avec le solvant phénol-alcool isoamylique-eau ; ils ne correspondent à aucun DNP-acide aminé connu. Il s'agit peut-être de DNP-galactosamine ?

2) Les mêmes acides aminés C-terminaux que ceux trouvés dans la caséine κ , ont été caractérisés après l'action de la carboxypeptidase, dans les trois caséino-glycopeptides ayant la caséine de vache pour origine : caséine entière, caséine α , caséine κ . Le caséino-glycopeptide de caséine κ a donné les proportions indiquées dans le tableau 23, après 3 heures d'action de l'enzyme. Un résidu terminal de valine correspond à un poids moléculaire de 8 300.

Les caséino-glycopeptides de brebis et de chèvre présentent une nouvelle différence avec ceux de vache ; après action de la carboxypeptidase nous avons caractérisé : Glu et Val. Glu n'existe pas dans la séquence C-terminale des caséino-glycopeptides de vache.

Le fait que les mêmes acides aminés C-terminaux aient été trouvés dans le caséino-glycopeptide et dans la caséine κ et le fait que la paracaséine κ ait une terminaison différente, permettent de penser que le caséino-glycopeptide se trouve placé dans la partie C-terminale de la caséine κ .

L'identité de la partie C-terminale des caséino-glycopeptides provenant des différentes caséines de vache, venant après les autres propriétés communes mentionnées précédemment, montre qu'ils ont la même origine, la caséine κ .

III. — Modes de liaison du phosphore dans le caséino-glycopeptide

Nous avons vu au chapitre IX que le caséino-glycopeptide de caséine κ contient 0,37 p. 100 de phosphore. Pour un poids moléculaire présumé de 8 000, on calcule qu'il y a 1 molécule de phosphore par molécule de peptide. Ce phosphore est lié à

l'un des résidus de sérine. En effet, l'application de la méthode décrite au chapitre VI (électrophorèse après hydrolyse acide ménagée) a permis de caractériser la phosphosérine.

IV. — Position de l'acide sialique dans le caséino-glycopeptide

La neuraminidase de *Vibrio cholerae* libère une grande partie de l'acide sialique des différents caséino-glycopeptides, dans un temps relativement court, 1 ou 2 heures, comme le montre le tableau 24. L'acide sialique se trouve donc en position terminale, en majeure partie du moins (107).

TABLEAU 24

Action de la neuraminidase sur les caséino-glycopeptides (77)

Caséino-glycopeptides	Acides sialiques (%)		Acides sialiques libérés (%) après une durée d'action de :	
	Acide N-acétyl-neuraminique	Acide N-acétyl-neuraminique + Acide N-glycolyl neuraminique	1 h	2 h
De caséine entière (vache) .	7,8	—	73	80
De caséine α (vache)	13,5	—	59	—
De caséine de brebis	—	1,0	—	95
De caséine de chèvre	—	2,8	—	99

V. — Unités trypsiques du caséino-glycopeptide

L'étude de l'enchaînement des acides aminés n'en est encore qu'à son début. Nous avons fait agir la trypsine, dans les conditions décrites au chapitre VI, sur le caséino-glycopeptide de caséine α de vache et sur le caséino-glycopeptide de caséine entière de chèvre. Deux peptides, contenant chacun un résidu de Lys, ont été caractérisés. Il reste à déterminer le peptide contenant le troisième résidu de Lys et la séquence C-terminale, dépourvue de Lys. Il est probable que les caséino-glycopeptides issus de différentes caséines de vache ont tous la même structure.

Les peptides connus ont la composition suivante (124):

a) Caséino-glycopeptide de caséine α de vache :

- 1) (Asp₂, Glu). Lys.
- 2) (Ala, Pro₂, Ileu). Lys.

b) Caséino-glycopeptide de caséine de chèvre :

- 1) (Asp₂, Thr₂, Ser₂, Glu₂, Pro, Ala₂, Val, Ileu). Lys.
- 2) (Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Ala, Val, Ileu, His). Lys.

VI. — Poids et rapports moléculaires

On peut calculer le poids moléculaire minimum approximativement d'après la composition en acides aminés donnée au chapitre VII, pour la caséine α , et au chapitre XI pour le caséino-glycopeptide et la paracaséine α , en déduisant un nombre proportionnel de molécules d'eau et en tenant compte du pourcentage de la partie peptidique.

Le tableau 25 présente les résultats.

TABLEAU 25
Poids et rapports moléculaires

	Caséino-glycopeptide	Caséine α	Paracaséine α
<i>Poids</i>			
partie peptidique.....	5 600	25 600	20 500
molécule	7 800	31 800	
<i>Nombre de résidus/molécule</i>			
acides aminés	54	224	181
acide phosphorique	1	2	1
galactose.....	3	3	
galactosamine (acétyl).....	3	2 à 3	
acide sialique	3 ou 4	2 à 3	
<i>Groupes/10⁵ g</i>			
acides totaux (1).....	238	186	
basiques (2).....	38	69	120
NH ₃	88	54	
hydroxyles (3)	188	110	92
<i>Rapport</i>			
Proline/acides aminés	1/8	1/10	1/11
Glucides/acides aminés	1/5,7	1/30	
Isoleucine/Leucine	5/1	1/1	0,8/1

(1) $H_2PO_3 \times 2 + Glu + Arg + ac. \text{ sialique (non corrigé pour les groupes amides) ;}$

(2) $Lys + Arg + His ;$

(3) $Thr + Ser.$

Le nombre de résidus de glucides par molécule ne peut être fixé avec certitude. Il est possible qu'une partie de ceux-ci ait échappé à l'analyse et se retrouve dans l'indosé. En ce qui concerne la paracaséine nous avons vu qu'il subsiste un doute sur la partie glucidique.

Au point de vue des rapports moléculaires, nous avons déjà fait précédemment quelques commentaires. Les groupes acides sont en excès par rapport aux groupes basiques ; surtout dans le caséino-glycopeptide, qui doit être plus chargé que la caséine α . Le rapport isoleucine/leucine est caractéristique.

Dans le caséino-glycopeptide la proline se trouve à une fréquence élevée parmi

les acides aminés. Il y a, d'autre part, un résidu de glucide pour 6 d'acides aminés. On remarque la présence de 3 séries :

— galactose, galactosamine, acide sialique.

Peut-être y a-t-il une molécule supplémentaire d'acide sialique?

La caséine κ contient apparemment un peu moins de résidus de glucides, par molécule, que le caséino-glycopeptide ; mais il est probable que la partie indosée, assez importante dans la caséine κ (14 p. 100) renferme des sucres.

VII. — Données et hypothèses sur la structure de la caséine κ et du caséino-glycopeptide

A) Dans la caséine κ il y a essentiellement la paracaséine et le caséino-glycopeptide. Les « petits constituants », dont nous avons montré l'existence au chapitre IX se trouvent dans une proportion qu'il est encore difficile de fixer et leur origine est obscure. Nous reviendrons longuement sur ce point dans la discussion.

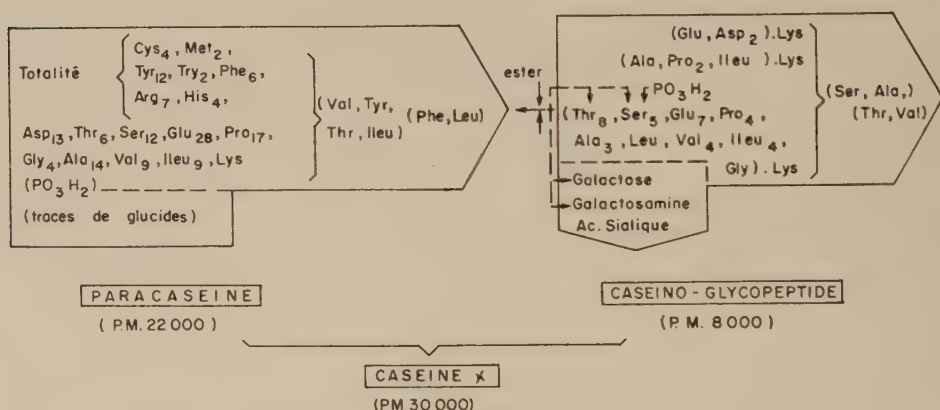


FIG. 35. — Représentation schématique de la structure de la caséine κ

Nous admettons, dans ce qui suit, que la molécule de caséine κ , substrat de la présure, est formée d'une molécule de paracaséine κ et d'une molécule de caséino-glycopeptide et que la présure coupe la liaison entre ces deux morceaux volumineux.

Les données acquises ne sont pas encore assez nombreuses pour pouvoir établir, même schématiquement, la structure de la caséine κ et de son caséino-glycopeptide. On sait cependant que :

1) Le caséino-glycopeptide doit se trouver placé à une extrémité de la molécule de la caséine κ .

2) La liaison entre les deux moitiés de la molécule, séparées par la présure, doit probablement se faire entre un acide aminé C-terminal de la paracaséine, Leu ou Phe et un groupe non encore déterminé du caséino-glycopeptide. Une liaison de type ester, entre le groupe carboxylique de Leu ou Phe et un groupe hydroxyle du caséino-glycopeptide, peut être envisagée, comme nous le verrons dans la discussion.

3) Le groupement aminé N-terminal de la caséine α et du caséino-glycopeptide n'est probablement pas libre.

4) La plus grande partie des sucres se trouve dans le caséino-glycopeptide.

5) Tous les acides aminés aromatiques et soufrés, toute l'arginine et l'histidine se trouvent dans la paracaséine.

6) En ce qui concerne le caséino-glycopeptide :

— l'acide sialique se trouve en position terminale, du moins en majeure partie ;

— un résidu d'acide phosphorique est lié à un des 6 résidus de Ser ;

— dans la moitié peptidique on peut distinguer 4 fragments reliés par 3 Lys.

La figure 35 schématise ces données.

B) On peut faire deux hypothèses sur la structure de base du caséino-glycopeptide :

a) *Chaîne peptidique* à laquelle est attachée :

— soit une chaîne latérale unique comprenant les 9 ou 10 résidus de glucides, ceux d'acide sialique se trouvant en position terminale ;

— soit une série régulière de groupement di- ou trisaccharidiques, comparables à des groupements prosthétiques multiples.

La chaîne peptidique, dans laquelle on n'a pu mettre en évidence aucun acide aminé N-terminal, n'est probablement pas ramifiée.

b) *Chaîne glucidique*, comparable à celle des glycopeptides des parois de certaines bactéries, à laquelle sont attachés des peptides.

Ces hypothèses seront discutées plus loin par comparaison avec ce qui est connu de la structure des glycoprotéines et des mucoïdes.

DISCUSSION

Dans cette partie de notre exposé nous discuterons nos résultats personnels en les confrontant avec ceux d'autres chercheurs.

I. — Le substrat de l'enzyme dans la réaction primaire

Les résultats que nous avons obtenus soutiennent la conception de WAUGH et v. HIPPEL (36) selon laquelle l'attaque immédiate et rapide de la présure porte sur la caséine κ , d'une manière spécifique. Cette réaction primaire se produit avec de faibles quantités d'enzyme et précède toujours la coagulation.

Ces résultats sont :

- a) La formation d'une proportion élevée d'azote non protéique avec la caséine κ (5 à 6 fois plus qu'avec la caséine entière) ;
- b) L'identité de la composition en acides aminés des caséino-glycopeptides provenant de différentes caséines de vache : caséine entière, caséine α et caséine κ ;
- c) L'identité des acides aminés C-terminaux dans ces caséino-glycopeptides ;
- d) La proportion élevée des glucides de la caséine κ se retrouvant dans le principal produit soluble de la réaction : le caséino-glycopeptide.

Ils confirment les conclusions des auteurs qui ont montré que les fractions de la caséine entière, autres que la caséine κ , ne donnent pas lieu à la formation de NPN dans les conditions que nous avons précisées : GARNIER (41), WAKE (42), et TSUGO et YAMAUCHI (127).

II. — La caséine κ

La caséine κ , substrat de la présure au cours de la réaction primaire, est-elle une protéine homogène ? Nous avons mentionné, au chapitre VII, les épreuves qui établissent son homogénéité. RIBADEAU DUMAS (114) l'a récemment mise en doute pour deux raisons :

- 1) Sur colonne de DEAE-cellulose en milieu urée, le pic d'élution correspondant à la caséine κ a une forme dissymétrique et le rapport de la densité optique à 280 m μ à la teneur en acide sialique n'est pas constant tout au long du pic.
- 2) L'immuno-électrophorèse en gélose révèle la présence de plusieurs lignes de précipitation.

Ces observations peuvent à leur tour recevoir des réponses : en ce qui concerne la première de ces observations on peut répondre en effet que le rapport considéré n'est peut-être pas un critère de pureté. Nous avons préparé plusieurs lots de caséine κ dont la teneur en acide sialique varie alors que la densité optique des solutions ne

varie pas (1,1 à 280 m μ , à pH 6,9, sous 1 cm, à la concentration en protéine de 1 mg/ml). En ce qui concerne la deuxième observation, l'auteur écrit lui-même : «... cette méthode très sensible peut avoir mis en évidence des impuretés qui n'existent qu'à l'état de trace (114) ».

Il faut noter que les examens électrophorétiques et chromatographiques de la caséine sur les supports glucidiques sont difficiles à interpréter ; on observe souvent des traînées et des taches diffuses qui laissent suggérer des interactions entre la caséine κ et le support. L'urée est nécessaire pour disperser moléculairement les constituants de la caséine et ce réactif peut exercer une action dénaturante.

Les constituants et sous-constituants de la caséine se multiplient rapidement au point que l'on risque d'épuiser prochainement les lettres de l'alphabet grec ; mais en considérant toutes les fractions séparées, on ne peut dire, pour chacune d'elles, qu'il ne s'agit pas d'artefacts.

Le poids moléculaire de la caséine κ prête également à discussion ; nous reviendrons plus loin sur ce sujet.

On peut comparer la caséine κ à la caséine α_3 , qui est le constituant insensible au calcium dans le fractionnement de McMEKIN et coll. (128). La composition en acides aminés de la caséine α_3 (108) et celle que nous avons déterminée pour la caséine κ présentent de grandes similitudes, mais la dernière a un contenu plus élevé en hydroxy-aminoacides. En ce qui concerne la partie non peptidique, on constate des écarts notables ; la caséine α_3 est plus riche en phosphore (0,35 p. 100) et plus pauvre en hexose (0,75 p. 100) et en acide sialique (1,2 p. 100) que la caséine κ . Au sujet de la teneur en phosphore, il faut noter que, dans le cas de la caséine κ , on peut la considérer comme un indice de pureté ; plus la purification progresse, plus la teneur en phosphore diminue.

La caséine κ peut être rangée dans le groupe des glycoprotéines, tel que le définit WINZLER (129) : composés ayant principalement un caractère protéique et contenant plus de 1 p. 100 de glucides unis à la partie protéique par une liaison ferme.

Dans la partie glucidique de la caséine nous avons trouvé les 3 types moléculaires habituellement rencontrés dans les glycoprotéines et en proportions voisines : hexose, hexosamine, acide sialique. En ce qui concerne la teneur en acide sialique tout récemment GIBBONS et CHEESEMAN (130) ont trouvé 0,8 p. 100. Cette valeur est environ trois fois moindre que celle que nous avons obtenue. Ces auteurs ont utilisé la même méthode d'analyse que nous-mêmes (81), par contre, ils ont préparé la caséine κ d'après une méthode nouvelle, non encore publiée. Il faut remarquer, d'autre part, que la caséine κ de GIBBONS et CHEESEMAN doit avoir une teneur en azote extraordinairement élevée ; d'après les résultats publiés, elle serait proche de 20 p. 100 (2 mg de caséine κ donnent 0,081 mg d'azote soluble après action de la présure, soit 20 p. 100 de l'azote de la caséine ; donc cette dernière contient 20,2 p. 100 d'azote). Par action de la neuraminidase ces auteurs obtiennent la libération complète de l'acide sialique en 5 heures de réaction (130) ; il occuperait donc une position terminale.

En ce qui concerne la composition glucidique des caséines entières de vache, chèvre, brebis et de la caséine humaine, les résultats de JOHANSSON et SVENNERHOLM (131) sont proches des nôtres, sauf pour la teneur en hexose et hexosamine de la caséine humaine (respectivement 1,98 et 1,3 p. 100) alors que nos valeurs sont

plus élevées (2,5 et 2,2 p. 100). Les teneurs en glucides de la caséine entière et de la caséine α de vache, établies par REYNOLDS et coll. (132) sont également proches de celles que nous avons indiquées, sauf pour les hexoses dans la caséine α : 0,15 p. 100 (notre résultat : 0,40 p. 100).

Dans la caséine entière de vache d'autres auteurs ont identifié le mannose (132, 133) et le glucose (132). Il est probable que les méthodes de purification poussée éliminent une partie de ces glucides. Par exemple, REYNOLDS et coll. (132) n'ont pas décelé de glucose dans la caséine α , alors que la caséine entière dont elle provient en contenait.

La caséine κ que nous avons examinée se caractérise par l'absence de groupe aminé terminal libre, pouvant être décelé par la méthode de SANGER (103). Dans la caséine α plusieurs chercheurs ont caractérisé deux acides aminés N-terminaux : la lysine et l'arginine : MELLON et coll. (134), WISSMANN et NITSCHMANN (135) et ISE (136). Cependant SENO (137) et récemment MANSON (138) n'ont caractérisé que la lysine. Ce dernier auteur a utilisé une caséine α exempte de caséine κ (elle correspond à la fraction α_s de WAUGH) ; on pourrait déduire de ce résultat que le résidu Arg terminal trouvé par les précédents auteurs provient de la caséine κ présente dans la caséine α qu'ils ont analysée. Nos résultats infirment cette hypothèse.

III. — Le caséino-glycopeptide

La réaction primaire de la présure sépare de la caséine κ la substance soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100, que nous avons appelée « Caséino-glycopeptide ». Sa composition a paru tout d'abord insolite par comparaison avec celle de la caséine dont il est issu. On peut considérer qu'il représente une réunion des composants de la caséine κ portant des groupes hydroxyles : théronine, sérine et glucides. Pour ces derniers il s'agit peut-être d'une séparation totale.

On peut ranger le caséino-glycopeptide dans le groupe des « mucoïdes » (129), en raison de sa teneur élevée en galactosamine (près de 8 p. 100) et en glucides totaux (près de 30 p. 100).

La partie glucidique présente des analogies avec celle de mucoïdes isolés de différents produits biologiques : mucoprotéine salivaire (139, 140), orosomucoïde (ou glycoprotéine acide α_1) du plasma sanguin (141 a), mucolipide cervical (142). Dans ces produits, l'acide sialique occupe la position terminale et est lié à un sucre ou à un sucre aminé, lequel est rattaché à la chaîne principale.

Dans la mucoprotéine salivaire de GOTTSCHALK (139), le dissaccharide : 6- α -D-sialyl-N-acétylgalactosamine est uni à la chaîne peptidique par une liaison ester-glycosidique, réductible par le borohydrure de lithium, entre le groupe réducteur de l'osamine et le groupe carboxylique de Glu ou Asp. Le dissaccharide précédent forme un groupement prosthétique réparti au long de la chaîne peptidique.

L. PAULING a suggéré la structure suivante pour la mucoprotéine de GOTTSCHALK : segments d'hélice α réunis d'une manière lâche par des résidus de proline, constituant le noyau protéique, autour duquel les groupes prosthétiques dissaccharidiques formeraient une hélice secondaire incomplète (143). Une telle structure n'est pas incompatible avec ce que l'on connaît de la composition du caséino-glyco-

peptide ; l'acide sialique occupe une position terminale, il se trouve en proportion moléculaire voisine de celle de la galactosamine ; il y a un résidu de Pro pour 8 acides aminés (1 pour 9 dans l'exemple précédent).

Dans le dernier chapitre nous avons envisagé d'autres hypothèses concernant la structure du caséino-glycopeptide. On connaît des exemples d'une seule séquence glucidique dans une glycoprotéine (144). Les 9 ou 10 résidus glucidiques du caséino-glycopeptide pourraient être ainsi disposés ; les résidus d'acides sialiques étant situés à l'extrémité libre.

Un type de structure que l'on pourrait considérer comme l'inverse du précédent, peut également être envisagé pour le caséino-glycopeptide : chaîne glucidique sur laquelle sont attachés des peptides. Un exemple bien connu est celui du glycopeptide des parois cellulaires de *Staphylococcus aureus* (145) ; la chaîne est formée de N-acétyl-galactosamine, dont un résidu sur deux porte le groupement lactyl (acide muramique). Un peptide composé de 5 résidus aminés est relié à chaque groupe lactyl. Ce type de structure semble moins bien convenir que le précédent, dans le cas du caséino-glycopeptide. En effet l'acide sialique doit en grande partie occuper une position terminale ; de plus nous n'avons pas pu caractériser d'acides aminés N-terminaux. Cependant une telle structure reste théoriquement possible.

La composition particulière de la partie peptidique du caséino-glycopeptide, que nous avons présentée au chapitre XI et la constance de cette composition d'une préparation à l'autre ont été également constatées par NITSCHMANN et coll. (43, 120, 146) et par HABERMANN et coll. (147), pour des préparations provenant de diverses caséines de vache. Il est à noter que l'absence d'acides aminés aromatiques dans la « protéose de HAMMARSTEN » avait été montrée, il y a longtemps déjà, par PORCHER et coll. (148).

Les auteurs précédents ont identifié les mêmes glucides que nous-mêmes, sauf HABERMANN et coll. (147) qui, dans une seule préparation sur quatre examinées, ont trouvé du xylose (à notre connaissance ce sucre n'a pas été décelé dans la caséine). Au point de vue quantitatif, des écarts importants existent entre les résultats de différentes déterminations des trois composants glucidiques ; les méthodes analytiques utilisées ne peuvent à elles seules en rendre compte. Il est probable que les méthodes préparatives ont une influence sur la teneur en glucides. Par exemple NITSCHMANN et HENZI (43) ont utilisé deux méthodes de préparation du caséino-glycopeptide. Par la précipitation à l'acide trichloracétique ils ont obtenu deux produits qui contenaient 22,7 et 30,9 p. 100 de glucides totaux ; par une séparation chromatographique sur le papier ils en ont obtenu deux autres qui contenaient 11,2 et 11,0 p. 100.

Les écarts concernent aussi bien les sucres que l'acide sialique, qui est le composant le plus labile.

Par des techniques de préparation entièrement différentes, VERMA et GRIMBLEY (149) ont obtenu un produit de la réaction, précipité par l'acétone, qui contient du fucose. Nous n'avons pas identifié ce sucre.

Nous avons montré que le phosphore du caséino-glycopeptide (1 atome par molécule) est sous forme d'acide phosphorique lié à la sérine. Dans la caséine il a été montré que le phosphore se trouvait sous forme de phosphosérine (150) et de phosphothréonine (151).

IV. — Le rôle de l'acide sialique. Le groupement prosthétique

Les conséquences de la présence de l'acide sialique dans une molécule de mucoprotéine, en ce qui concerne certaines propriétés de cette dernière, ont été mises en évidence par GORTSCHALK et THOMAS (143) ; elles découlent de la forte charge négative du groupe carboxylique (pK 2,6). La répulsion électrostatique des groupes carboxyliques de l'acide sialique s'ajoute à l'effet des liaisons hydrogènes entre les groupements prosthétiques voisins pour maintenir la rigidité moléculaire, en dépit de la flexibilité potentielle aux endroits des liaisons par les résidus de proline. La molécule possède une forme allongée, avec un rapport axial élevé (152). Si l'on réduit l'ionisation de l'acide sialique, par abaissement du pH, ou si on le détache par l'action de la neuraminidase, la molécule prend une forme compacte et les propriétés physiques de la mucoprotéine sont modifiées (chute de la viscosité des solutions dans l'exemple cité).

Il a été montré que l'acide sialique contrôle certaines propriétés physico-chimiques et biochimiques des mucoprotéines. D'après JEANLOZ, il s'agit d'un des problèmes les plus importants, en ce qui concerne ce type de substance (141 b).

Le caséino-glycopeptide a une propriété importante : il ne traverse pas les membranes celluloses utilisées pour la dialyse. Cette propriété est probablement la conséquence de la forme de la molécule et de sa charge.

En ce qui concerne la caséine κ , l'acide sialique joue peut-être un rôle dans sa propriété capitale : la stabilisation des constituants de la micelle de caséine entière. D'après WAUGH (153), la caséine κ est la molécule la plus rigide du complexe et son aptitude à former, en interaction avec la fraction α_s , des micelles stables serait en rapport avec cette rigidité moléculaire. Nous avons montré que la caséine κ est la fraction de beaucoup la plus riche en acide sialique (caséine entière 0,36 p. 100, caséine κ 2,3 p. 100).

A ce point de vue, l'acide sialique facteur de rigidité, et les glucides facteurs de solubilité, s'ils étaient liés ensemble, pourraient être considérés comme formant le ou les groupements prosthétiques actifs de la caséine κ . Lorsque la molécule est coupée en deux parties inégales, le caséino-glycopeptide se sépare et les propriétés du résidu, la paracaséine κ , isolée ou associée aux autres fractions de la caséine, sont profondément modifiées, avec diminution de la solubilité et disparition du pouvoir stabilisant.

GIBBONS et CHEESEMAN (130) ont montré que la caséine κ , privée de l'acide sialique par action de la neuraminidase, réagit encore avec la présure ; mais on ignore si la caséine κ privée de l'acide sialique conserve ses propriétés stabilisantes.

V. — La liaison coupée par la présure

La question de l'activité protéolytique de la présure est débattue depuis longtemps. HOLTER (14), dans des expériences minutieuses, n'a constaté, au cours de l'action de la présure ordinaire (non cristallisée) sur la caséine, qu'une très faible augmentation du nombre des groupes basiques, dépassant à peine les limites d'erreur

de la méthode. NITSCHMANN et VARIN (154) ont repris ces mesures titrimétriques ; ils ont utilisé la présure cristallisée à très forte dose (10 000 fois plus que dans nos expériences, en moyenne) et l'ont fait réagir sur la caséine entière. Après une durée d'action correspondant à celle de la coagulation, ils n'ont pas constaté une augmentation sensible du nombre de groupes acides et basiques. Après un temps beaucoup plus long, en moyenne 0,25 milliéquivalents de groupes titrables par gramme de caséine ont été mesurés à pH 6,8 et à pH 2,3. Les auteurs n'ont pas pu conclure sur la nature des liaisons coupées dans ces conditions exceptionnelles ; elles pourraient être aussi bien peptidiques que phosphamidiques ou du type ester.

Récemment, par la méthode titrimétrique à pH constant, GARNIER et coll. (155) ont montré qu'un très petit nombre de groupes ionisables apparaît après action de la présure sur la caséine κ , le rapport étant un groupe pour 55 000 g de caséine κ . c'est-à-dire une quantité approximativement double du poids moléculaire indiqué précédemment. Ce groupe a un pK moyen compris entre 4 et 5 ; ce qui exclut la possibilité de coupure d'une liaison impliquant un acide α -aminé et ce qui conduit à penser à une liaison du type ester dont le groupe ionisable serait un groupe carboxylique.

Le fait que nous n'ayons pu mettre en évidence aucun acide aminé N-terminal, ni dans le caséino-glycopeptide ni dans la paracaséine, après l'action de la présure sur la caséine κ , apporte un argument contre la coupure d'une liaison peptidique. NITSCHMANN et coll. (120) n'ont également pas pu déceler d'acide aminé N-terminal dans le caséino-glycopeptide de caséine entière que nous leur avons fourni ; par contre ils ont constaté l'apparition de la phénylalanine comme groupe aminé N-terminal, après action de la présure sur la caséine α (135). WAKE (156), qui n'a pas constaté de différence entre la caséine κ et la paracaséine κ au point de vue des groupes N-terminaux, explique le résultat contradictoire de NITSCHMANN et WISSMANN (135) comme la conséquence de l'activité protéolytique non spécifique de la présure, accrue par l'ajustement du pH à 4,6 à la fin de l'expérience. Cette explication se réfère aux travaux de FISH (157) qui a cherché à déterminer la spécificité de la présure réagissant sur la chaîne B de l'insuline (voir plus loin).

Compte tenu de nos résultats et de ceux de GARNIER et coll. (155) on peut faire l'hypothèse de l'existence, entre la paracaséine et le caséino-glycopeptide d'une liaison impliquant un des deux acides C-terminaux que nous avons décelés dans la première ; Leu ou Phe, et un groupe hydroxyle appartenant à un constituant du caséino-glycopeptide : thréonine, sérine, galactose, galactosamine. L'acide sialique n'est probablement pas impliqué dans cette liaison du fait qu'il occupe une position terminale.

VI. — La réaction primaire

La coupure de la liaison considérée ici intervient au cours de la réaction spécifique (réaction primaire). La cinétique de cette réaction peut être étudiée au moyen de la méthode que nous avons décrite : détermination en fonction du temps, de l'azote non protéique soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale. Nous avons noté l'influence de la concentration de l'enzyme et de la concentration du substrat. Au moyen de cette méthode, d'autres chercheurs ont précisé l'influence

de divers facteurs. NITSCHMANN et BOHREN (27) ont assimilé la réaction primaire à une réaction chimique du premier ordre ; ils ont montré que son optimum doit se situer entre pH 3,5 et pH 5,5 ; vers pH 2 la réaction primaire ne se produit plus ; cependant la présure n'est pas inactivée car la réaction non spécifique de protéolyse générale se poursuit. D'après ces auteurs, le coefficient de température Q_{10} de la réaction spécifique varie peu de 10 à 30°C ; il est en moyenne de 1,8. MATTENHEIMER et NITSCHMANN (32) ont montré que le calcium n'exerce aucune influence sur cette réaction (alors que la phase secondaire de la coagulation est sous la dépendance de la concentration en calcium ionisé). Cette méthode d'étude de la réaction a été également utilisée par les chercheurs qui étudient l'action de la présure sur les fractions constituant la caséine entière et sur d'autres substrats (28, 41, 42, 127, 156).

La réaction primaire s'apparente aux réactions de protéolyse spécifique limitée au cours desquelles une nouvelle espèce de protéine est formée par séparation d'un peptide. C'est notamment le cas de l'activation de proenzymes : pepsinogène, trypsinogène, chymotrypsinogène (voir en particulier DESNUELLE et ROVERY (158)). La réaction de la thrombine sur le fibrinogène présente de grandes similitudes avec celle de la présure : la formation de la fibrine s'accompagne de la libération de deux fibrino-peptides (64) ; la réaction est très rapide.

En terminant cette partie de la discussion on peut mentionner les hypothèses, selon lesquelles la présure ne provoquerait pas de modification notable dans la molécule de caséine et ne détacherait pas un morceau de celle-ci par coupure d'une liaison. CHERBULIEZ et JEANNERAT (18) pensent que le produit soluble de la réaction n'est autre que leur « caséine δ » ; il s'agit d'une fraction que l'on peut séparer de la caséine entière par précipitations fractionnées ; cette fraction est très pauvre en tryptophane. DYATCHENKO (159) pense que la présure coupe une liaison phosphamide du type : $-O-P-NH-$ sans libération d'acide phosphorique ; l'apparition de deux groupes ionisables (aminé et acide phosphorique) expliquerait les propriétés nouvelles de la paracaséine.

De telles hypothèses paraissent être insoutenables aujourd'hui, étant donné ce que l'on sait de l'action de la présure sur la caséine κ .

VII. — L'activité protéolytique de la présure

En dehors de la réaction primaire, de la présure, nous avons mis en évidence une réaction de « protéolyse générale » que l'on peut suivre dans le temps en précipitant les protéines du mélange réactionnel par l'acide trichloracétique à 2 p. 100. Elle se poursuit à faible vitesse, dans les conditions de nos expériences, au-delà du temps nécessaire à la coagulation.

La réaction protéolytique de la présure sur différents substrats a été étudiée par BERRIDGE (25) et de BAUN et coll. (160) sur l'hémoglobine ; le pH optimum se situe entre 3,8 et 4,0 (alors que la pepsine, contenue dans les présures non purifiées, a dans ces conditions un pH optimum d'action vers 1,8-2,0). FISH (157) a trouvé le même pH optimum pour la présure réagissant sur la chaîne B de l'insuline ; il a montré que le mode d'action de la présure est voisin de celui de la pepsine et

qu'elle agit sur un substrat de celle-ci : la carbobenzoxyglutamyltyrosine, alors qu'elle n'agit pas sur un substrat de la chymotrypsine : l'acétyltyrosine éthylester et qu'elle n'a pas d'activité phosphamidase.

Lorsqu'on étudie les activités enzymatiques de la présure, il faut donc distinguer la réaction protéolytique non spécifique de la réaction primaire ; cette dernière n'est probablement pas une protéolyse.

VIII. — Les « petits constituants »

Le très petit nombre de liaisons coupées par la présure (14, 154, 155), dans les conditions de nos expériences, rend difficilement explicable la présence en faibles proportions dans la partie soluble des constituants, autres que le caséino-glycopeptide, et qui sont décelés par chromatographie ou par électrophorèse.

Dans le cas de la déprotéinisation par l'acide trichloracétique on peut supposer qu'ils représentent des fragments de la caséine détachés par l'action propre de ce réactif et formant ce que nous avons dénommé « NPN-O ».

Dans le cas du surnageant de la paracaséine κ , ou du filtrat obtenu après acidification à pH 4,6, l'origine de ces substances est obscure. On peut faire plusieurs hypothèses :

1) Il s'agirait de légères modifications des molécules du caséino-glycopeptide ou de la paracaséine, avec changement de la charge nette. Dans le cas du caséino-glycopeptide, on peut envisager la formation d'associations moléculaires, comme semble l'indiquer une expérience de filtration sur Séphadex (chapitre IX).

2) NITSCHMANN et HENZI (43) pensent que des peptides feraient partie de l'association que forment les constituants de la caséine entière et qu'ils ne seraient pas complètement éliminés par les précipitations répétées à pH 4,6. En faveur de cette hypothèse on peut avancer le caractère acide de la caséine et la présence d'un ou plusieurs constituants basiques ; ceux-ci seraient libérés, sans rupture de liaison, au cours de l'action de la présure, ou au cours de certains traitements comme la déprotéinisation par l'acide trichloracétique. Dans le cas de la caséine κ , qui a subi de multiples opérations de purification, notamment des dissolutions dans l'urée suivies de réprécipitation, il semble improbable que des peptides retenus par des liaisons lâches, n'aient pas été éliminés.

IX. — Les bilans analytiques et les poids moléculaires

Les résultats que nous avons obtenus par l'analyse de la caséine κ et des différents caséino-glycopeptides, en ce qui concerne les acides aminés, les sucres réducteurs, les sucres aminés, les acides sialiques et l'acide phosphorique, font apparaître un reste indosé, qui représente en moyenne 13 p. 100 de la substance sèche. Nous n'avons aucune indication concernant la présence éventuelle d'autres types de composants, en dehors de la possibilité du blocage des groupes aminés terminaux par un acide organique.

Ces bilans analytiques déficitaires constituent une anomalie ; mais une ano-

malie qui semble être la règle dans le domaine des glycoprotéines et des mucoïdes. Par exemple WEIMER et coll. (161) en analysant l'orosomucoïde du plasma humain ne retrouvent que 86 p. 100 du poids total. GOTTSCHALK et SIMMONDS (125) écrivent : « un bilan complet des constituants d'une mucoprotéine riche en glucides semble actuellement irréalisable » ; dans l'analyse de la mucoprotéine salivaire du mouton leurs résultats ne rendent compte que de 88,7 p. 100 du poids total de la substance. Outre la destruction d'acides aminés au cours de l'hydrolyse chlorhydrique totale, ces auteurs indiquent deux autres causes de déficit :

1) Perte d'acides aminés par condensation irréversible avec des constituants glucidiques.

2) Pertes au cours de la détermination des sucres.

GHUYSEN (102) a souligné les difficultés que présente la détermination des sucres réducteurs dans un mucopeptide ; une certaine quantité de sucres libérée au début de l'hydrolyse peut être ensuite détruite ; cependant, après 3 heures d'hydrolyse, il reste encore du sucre qui échappe à l'analyse. Cet auteur obtient une proportion supérieure de sucres par le dosage à la diphénylamine, sans hydrolyse préalable. Nous avons essayé cette méthode ; elle ne convient pas dans notre cas du fait de la forte interférence due à l'acide sialique.

Il est vraisemblable que les valeurs indiquées aux chapitres précédents, pour les composants glucidiques, sont en dessous des valeurs réelles, par suite de la présence probable de ces composants dans l'indosé. L'erreur relative sur la partie peptidique la plus abondante, doit être faible, d'autant plus que nous avons tenu compte de la destruction partielle de la sérine et de la thréonine au cours de l'hydrolyse.

Si une partie du reste analytique était constituée par les glucides incomplètement dosés, l'erreur par défaut sur la proportion des composants glucidiques serait plus forte dans la caséine α , du fait de la proportion élevée de l'indosé (14 p. 100) et de la proportion assez faible des glucides (5,7 p. 100), que dans le caséino-glycopeptide où la teneur en glucides est beaucoup plus élevée (29 p. 100) et l'indosé plus faible que dans la caséine α (9 p. 100).

Nous avons vu au chapitre XII que la molécule de caséine α ne contient pas assez d'acide sialique et de galactosamine, d'après les résultats du dosage direct, pour pouvoir donner une molécule de caséino-glycopeptide. Compte tenu de l'observation précédente, on peut supposer que la teneur réelle en glucides de la caséine α est suffisante pour que cette condition soit satisfaite.

Les poids moléculaires, calculés d'après la composition en acides aminés (caséine α : 31 800, caséino-glycopeptide α : 7 800), sont en accord avec ceux qui correspondent à un résidu C-terminal (respectivement 32 000 et 8 300).

La détermination par les méthodes physiques (sédimentation-diffusion), effectuée par NITSCHMANN et coll. (120) sur une de nos préparations de caséino-glycopeptide, a conduit à admettre un poids moléculaire compris entre 6 et 8 000, donc du même ordre de grandeur que les valeurs ci-dessus. Par contre BRUNNER et THOMPSON (103) ont déduit, par les mêmes méthodes, un poids moléculaire de 15 300, soit environ le double des précédents. Il pourrait s'agir d'un dimère. Ces auteurs ont préparé le caséino-glycopeptide selon une technique un peu différente de la nôtre (la précipitation avec 12 p. 100 de TCA a été faite sur le filtrat obtenu à pH 4,6, après action de la présure sur la caséine entière) ; leur produit a une teneur en phosphore relativement élevée : 0,6 p. 100.

Pour la caséine α , McKENZIE et WAKE (115) ont calculé un poids moléculaire approximatif de $26\,000 \pm 3\,000$, par la méthode de sédimentation-diffusion et la mesure de l'équilibre de sédimentation à pH 12. Cette valeur est plus faible que celle que nous avons indiquée : 32 000 ; elle reste cependant du même ordre de grandeur. Par contre, WAUGH (40) a calculé un poids moléculaire de 16 000, soit la moitié exactement de notre valeur. Ce poids de 16 000 est incompatible avec la proportion de caséino-glycopeptide formé, de même qu'avec la composition de ce dernier et celle de la caséine α .

D'après les mesures titrimétriques à pH constant que nous avons mentionnées à propos de la discussion sur les liaisons rompues (155), le poids moléculaire de la caséine α devrait être de 55 000 au moins, soit deux fois plus que celui donné par McKENZIE et WAKE (115).

Il règne donc une incertitude sur le poids moléculaire du substrat : la caséine α . Cependant l'écart relativement faible entre la valeur que nous déduisons des analyses chimiques (32 000) et celle que McKENZIE et WAKE ont déduit des mesures physiques ($26\,000 \pm 3\,000$) nous incline à penser que le poids moléculaire doit être proche de 30 000.

Après précipitation du mélange réactionnel « caséine + présure » par l'acide trichloracétique à 12 p. 100, on obtient le caséino-glycopeptide qui représente environ 12 p. 100 en poids de la caséine α ; alors que dans le surnageant de la coagulation (sans acide trichloracétique) les matières azotées représentent 24 p. 100 environ de la caséine α . Si l'on considérait que le caséino-glycopeptide, dont le poids moléculaire présumé est 7 800, se trouve entièrement dans le filtrat à 12 p. 100 de TCA, il faudrait admettre pour la caséine α un poids moléculaire plus élevé que celui que nous avons indiqué. Mais il ressort des expériences que nous avons faites sur la paracaséine et sur la formation des produits solubles de la réaction, qu'une partie de ces derniers est adsorbée sur le précipité. De ce fait la proportion réelle du caséino-glycopeptide détaché de la caséine α est certainement supérieure à 12 p. 100.

X. — La paracaséine α

Après l'action de la présure sur la caséine α et la séparation du caséino-glycopeptide, la molécule protéique, modifiée, qui devient insoluble dans le mélange réactionnel, constitue la paracaséine α . La purification est malaisée ; nous avons constaté que la répétition des lavages fait baisser la teneur en glucides. Une purification, telle que l'effectue WAKE (156), par lavage du précipité à l'alcool et à l'éther, nous a donné un produit contenant encore 3,7 p. 100 de glucides. Nous avons mis à profit la solubilité de la paracaséine dans l'acide acétique pour obtenir une purification plus poussée, car elle reprécipite en élevant le pH au-dessus de 4,6. La substance ainsi traitée ne contient plus que 2 p. 100 de glucides et seulement 0,5 p. 100 d'acide sialique. La paracaséine pure ne doit contenir que très peu, ou pas du tout, de glucides.

Selon GIBBONS et CHEESEMAN (130), après l'action de la présure tout l'acide sialique de la caséine α passe dans le surnageant ; la paracaséine α serait privée de ce corps.

XI. — Pureté de l'enzyme

La présure cristallisée que nous avons préparée, de même que celle qui nous a été donnée par FOLTMANN (62), présente un seul pic à l'électrophorèse selon TISELIUS à pH 6,0. SCHWANDER et coll. (164), avec une préparation de BERRIDGE, ont trouvé le même résultat et ceci à différentes valeurs du pH ; ils en ont conclu que le point isoélectrique devait être proche de celui de la caséine : 4,6. Par contre, ces auteurs ont trouvé que cette présure n'était pas tout à fait homogène dans les examens de sédimentation et de diffusion (le poids moléculaire serait voisin de 40 000).

En étudiant la solubilité, FOLTMANN (62) a conclu que la présure se comportait comme un système à constituant unique.

ERNSTROM (165), en soumettant à l'électrophorèse une présure cristallisée obtenue selon une méthode différente des précédentes, a observé plusieurs pics avec une solution tampon de très faible force ionique (0,03) ; alors qu'avec une force ionique de 0,2 il n'observerait qu'un seul pic.

On pourrait considérer comme une preuve plus convaincante de l'hétérogénéité de la présure cristallisée, les résultats de FOLTMANN (166) ; cet auteur a obtenu par chromatographie sur DEAE-cellulose, trois pics possédant l'activité coagulante ; l'activité spécifique (UP/E_{278}) est différente dans les trois pics. Si l'on admettait que les conditions expérimentales n'ont pas provoqué de modifications de la substance originelle, il faudrait conclure de ces résultats que trois molécules différentes, possédant l'activité enzymatique caractéristique de la présure, cristallisent ensemble.

XII. — Action de la présure sur la caséine d'autres espèces

Peu de travaux scientifiques ont été publiés concernant la réaction de la présure sur la caséine d'autres espèces que l'espèce bovine. Nos résultats montrent que la caséine de chèvre se comporte comme celle de vache et que, par contre, la caséine de brebis, ayant la même teneur en azote que les précédentes, donne plus d'azote non protéique à 12 p. 100 de TCA (caséino-glycopeptide) et moins de protéose soluble à pH 4,6 que les caséines de vache et de chèvre ; si bien que la proportion des substances solubles est la même dans les deux conditions, avec la caséine de brebis. GARNIER (167) a constaté que la caséine de brebis donne deux fois plus d'azote non protéique à 12 p. 100 de TCA que la caséine de vache (dans nos expériences le rapport est plus faible (1,5/1)) et que la proportion d'azote non protéique à 2 p. 100 de TCA est approximativement la même qu'à 12 p. 100.

Pour éclaircir cette question il faudrait connaître la proportion, dans la caséine de brebis, du composant correspondant à la caséine α de vache et le séparer, afin d'étudier son comportement vis-à-vis de la présure. Nous n'avons pas encore réussi à le préparer à l'état pur, par la méthode de MCKENZIE et WAKE (51) ; il ne se produit pas de précipitation par l'alcool et l'acétate d'ammonium, au stade de la purification où se sépare la caséine α de vache. Cependant, le produit que nous avons obtenu, possède les propriétés caractéristiques de la caséine α . Bien qu'étant incomplètement purifié, il donne un précipité en présence de présure (sans ions Ca^{2+}) et

il donne une proportion de NPN supérieure à celle que donne la caséine α de vache. Il semble donc que la caséine α de brebis se distingue de la caséine α de vache par une plus grande sensibilité à l'action de la présure.

Nous n'avons trouvé dans la littérature consultée aucune référence concernant les caséino-glycopeptides de brebis et de chèvre. Ils sont très voisins, par leur composition, de celui de vache. Il est probable que la présure réagit selon le même processus sur toutes les caséines des ruminants. Les différences spécifiques sont légères : d'une part les caséino-glycopeptides de brebis ou de chèvre contiennent de l'histidine, mais ne contiennent ni leucine, ni glycocolle ; d'autre part ils contiennent l'acide N-glycolylneuraminique en plus de l'acide N-acétylneuraminique. A ce sujet, il est curieux de constater que l'acide N-acétyl se trouve presque pur dans la mucoprotéine salivaire du mouton (140) (on l'a dénommé O-sialique : O pour ovin), alors qu'il est en faible proportion, à côté de l'acide N-glycolyl dominant, dans la caséine ovine.

Nous avons vu que la caséine humaine, préparée selon la même méthode que la caséine de vache, subit d'une manière irrégulière l'action de la présure ; une seule préparation sur quatre a donné une quantité appréciable de NPN (12 p. 100). Il s'agit cependant de caséines provenant de laits de mélange d'un lactarium. Il est à noter que KELLER (168) à partir d'une seule préparation de caséine humaine, a observé une formation de NPN (12 p. 100) comparable à celle que l'on obtient avec la caséine de vache. Selon IMADO et coll. (169), qui ont fait des examens comparatifs des caséines humaine et bovine, la première ne contiendrait pas de constituant semblable à la caséine α et elle serait moins sensible à la présure.

XIII. — La présure et les autres enzymes coagulant le lait

La pepsine donne une courbe d'azote non protéique à 12 p. 100 d'acide trichloracétique presque identique à celle de la présure (32), (127), mais la réaction cesse de se produire vers pH 6,7 et au-dessus ; alors que la présure est encore active (la pepsine ne coagule pas les laits frais dont le pH est relativement élevé).

CERBULIS et coll. (170) ont comparé l'action de la pepsine à celle de la présure sur la caséine entière à pH 6,4. Les deux enzymes produisent à peu près les mêmes effets, mais la présure donne moins de composants solubles à pH 4,6 que la pepsine. Elle a une spécificité plus étroite que cette dernière. C'est également la conclusion des travaux de LINDQVIST et STORGARD (171).

HABERMANN et coll. (147) ont préparé, par action de la pepsine sur la caséine entière de vache à pH 6,8, un caséino-glycopeptide dont la composition est voisine de celle du caséino-glycopeptide préparé par action de la présure.

Par contre, la pepsine se différencie nettement de la présure par son pH optimum d'activité dans la réaction de protéolyse générale, comme nous l'avons vu précédemment (présure : pH 4, pepsine : pH 2). Elle s'en différencie également par l'intensité de la protéolyse. La pepsine produit, aux dépens de la caséine α , des peptides et des acides aminés ; alors que la présure ne produit que des polypeptides (172).

La présure et la pepsine se distinguent des autres enzymes pouvant coaguler le lait par le fait qu'elles donnent lieu à la réaction primaire, représentée par la courbe

caractéristique $\text{NPN} / (t)$. Avec les autres enzymes, la réaction protéolytique générale se manifeste en même temps et la réaction primaire est peu visible ou même apparemment inexistante. Tel est le cas de la protéase de *Bacillus mesentericus* que nous avons étudiée et d'autres enzymes : chymotrypsine, trypsine, papaïne, etc. étudiées par MATTENHEIMER et NITSCHMANN (32). C'est également le cas de différents enzymes étudiés par les chercheurs japonais (173, 174) : protéases de *Bacillus* et *Pseudomonas* ; ficine, extraite du figuier ; enzymes extraits de testicules de lapin, et d'autres viscères.

Étant donné que ces diverses protéases ont une activité protéolytique non spécifique élevée, par rapport à l'activité coagulante, leur emploi en pratique pour coaguler le lait conduit à des résultats différents de ceux que donne la présure.

En résumé, l'activité protéolytique non spécifique de la présure, dans les conditions normales de la coagulation du lait, à pH 6,6-6,8, est très réduite. Par contre, l'activité enzymatique spécifique, non protéolytique, se manifeste rapidement dans la réaction primaire. Elle provoque la séparation du caséino-glycopeptide de caséine κ , en ne coupant qu'un très petit nombre de liaisons de valences principales. Cette modification limitée est suffisante pour faire perdre à la caséine κ , transformée en paracaséine κ , sa propriété essentielle de facteur stabilisant pour les constituants de la micelle de caséine, qui précipitent ensemble lorsque le milieu contient du calcium.

RÉSUMÉ

Le présent travail décrit :

1. La préparation des substrats : caséines entières de vache, de brebis, de chèvre ; caséine humaine ; caséine κ et caséine α de vache.

2. La préparation de la présure cristallisée ; une méthode originale par électrophorèse en gélose est présentée.

3. La formation des produits solubles, issus de la réaction de la présure sur la caséine, dans différentes conditions de déprotéinisation et plus particulièrement en précipitant les protéines par l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale.

4. L'analyse chimique de la caséine κ et celle du caséino-glycopeptide, qui constitue le principal produit soluble de la réaction.

5. L'étude de la structure partielle de ces substances.

6. L'action de la présure sur les caséines de brebis et de chèvre et sur la caséine humaine.

La caséine κ est une glycoprotéine contenant une partie peptidique (81 p. 100) et une partie glucidique (6 p. 100) composée de galactose, de galactosamine et d'acide sialique. Elle contient également de l'acide phosphorique. Il reste une partie indosée, comme dans beaucoup d'autres glycoprotéines connues. Le poids moléculaire doit être proche de 30 000.

En déterminant l'azote non protéique dans le filtrat trichloracétique à 12 p. 100, au cours de l'action de la présure sur les solutions de caséine, on met en évidence la réaction primaire spécifique qui précède la coagulation. Cette réaction aboutit à la séparation du caséino-glycopeptide, que l'on trouve presque à l'état pur dans le filtrat. La vitesse de la réaction est très élevée au début ; elle devient ensuite rapidement nulle. Cette réaction s'apparente aux réactions de protéolyse limitée, comme celle qui se produit entre la thrombine et le fibrinogène et qui intervient dans la coagulation du sang.

La réaction primaire est distincte d'une réaction de protéolyse non spécifique de la présure ; cette dernière se poursuit à vitesse constante au-delà de la coagulation et les produits formés sont insolubles ou peu solubles dans 12 p. 100 d'acide trichloracétique.

A partir de la caséine κ on obtient 5 fois plus de caséino-glycopeptide (12 p. 100) qu'à partir de la caséine entière de vache (2,2 p. 100). La partie peptidique des caséino-glycopeptides provenant de la caséine entière, de la caséine α et de la caséine κ a la même composition en acides aminés et la même séquence C-terminale. Ces résultats confirment la conception du substrat spécifique de la présure, au cours de la réaction primaire, que constitue la caséine κ .

Le caséino-glycopeptide détaché de la caséine κ par la présure a un poids moléculaire élevé, environ 8 000, soit plus du quart du poids moléculaire du substrat. Il possède les mêmes acides aminés C-terminaux que la caséine κ (Thr, Val). Après action de la présure, deux autres acides C-terminaux apparaissent dans la paracaséine κ (Phe, Leu). Il est donc probable que le caséino-glycopeptide se trouve placé à l'extrémité de la molécule de la caséine κ et qu'il est lié à la paracaséine par le groupe carboxylique de Leu ou de Phe, appartenant à cette dernière. Le fait que l'on n'ait pu mettre en évidence aucun acide aminé N-terminal dans la paracaséine κ et le caséino-glycopeptide, confirme l'hypothèse que la liaison entre ces deux substances, rompue par la présure, n'est pas du type peptidique. D'après les résultats d'autres auteurs, une liaison du type ester peut être envisagée ; elle impliquerait donc Leu ou Phe et le groupe hydroxyle d'un constituant du caséino-glycopeptide : hydroxyaminoacide ou glucide.

Le caséino-glycopeptide est un mucoïde contenant près de 30 p. 100 de glucides ; en proportions sensiblement équimoléculaires se trouvent le galactose, la galactosamine et l'acide O-sialique. L'acide sialique est en position terminale. Le caséino-glycopeptide emporte la majeure partie des glucides de la caséine κ .

Dans la partie peptidique on constate une forte proportion d'hydroxyaminoacides (20 p. 100) ; leur présence, à côté des glucides, explique la grande solubilité du caséino-glycopeptide. Les acides aminés aromatiques et soufrés et l'arginine sont absents. Les groupes acides sont en fort excès sur les groupes basiques. Aux groupes carboxyliques des diacides aminés s'ajoutent les groupes fortement chargés de l'acide sialique (4 par molécule) et un groupe acide phosphorique. Le caséino-glycopeptide a un caractère acide encore plus marqué que la caséine κ .

Le bilan analytique du caséino-glycopeptide est déficitaire, comme celui de la caséine κ , mais la partie indosée est un peu moins importante (9 p. 100 au lieu de 13 p. 100). Les difficultés de l'étude des glycoprotéines et mucoides ont été soulignées au cours de ce travail. Les méthodes expérimentales de traitement et d'analyse ont une influence notable sur les résultats relatifs à la partie glucidique.

Les caséines de brebis et de chèvre donnent également lieu à la réaction primaire. Le caséino-glycopeptide obtenu à partir de ces caséines a une composition en acides aminés très voisine de celle du caséino-glycopeptide de vache. La partie glucidique contient, à côté du galactose et de la galactosamine, deux acides sialiques, l'acide N-acétyl et l'acide N-glycolylneuraminique. Il est à noter que la caséine de brebis se distingue des deux autres par la formation d'une quantité plus élevée de caséino-glycopeptide.

La caséine humaine se comporte différemment des caséines animales étudiées. La présure agit d'une manière irrégulière, selon les préparations ; il se forme peu ou pas d'azote non protéique.

En ce qui concerne la structure du caséino-glycopeptide des hypothèses ont été faites, par comparaison avec ce que l'on sait de la structure de mucoides connus. Il est possible que les résidus glucidiques soient réunis en groupements prosthétiques portant l'acide sialique en position terminale.

L'acide sialique joue probablement un rôle dans les propriétés de la molécule : solubilité et rigidité moléculaire.

Lorsque la présure a réagi sur la caséine κ , celle-ci perd ses groupements prosthétiques ; il en résulte la formation d'une protéine insoluble, la paracaséine. Cette dernière est dépourvue de la propriété essentielle de la caséine κ : la stabilisation des autres composants (caséine α_s et caséine β principalement) constituant les micelles natives de caséine, telles qu'elles existent dans le lait. La conséquence de cette modification de la caséine κ est la coagulation du lait.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) G. MOCQUOT, C. ALAIS, et R. CHEVALIER. *Ann. Technologie Agricole*, **2** (1954), 1.
- (2) C. OPPENHEIMER. « Die Fermente und Ihre Wirkungen », Leipzig (1926).
- (3) G. T. PYNE. *Dairy Sci. Abstr.*, **17** (1955), 531.
- (4) N. J. BERRIDGE. In « *Advances in Enzymology* », vol. 15, 423-446 (F. Nord Edit.), Interscience Publisher, New York (1954).
- (5) N. J. BERRIDGE. In « *Methods in Enzymology* », vol. 2, 69-77 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan Edit.), Academic Press New York (1955).
- (6) O. HAMMARSTEN. *Jahresber. Fortschr. Tierchem.*, **2** (1872), 118.
- (7) O. HAMMARSTEN. *Upsala Läkareförhandl.*, **11** (1876), 538.
- (8) O. HAMMARSTEN. *Jahresber. Fortschr. Tierchem.*, **4** (1874), 135.
- (9) Ch. PORCHER. *Lait*, **10** (1930), 417, 509, 667, 794, 900 et 1011.
- (10) O. HAMMARSTEN. *Z. Physiol. Chem.*, **7** (1883), 227 et **9** (1885), 273.
- (11) T. B. OSBORNE et A. WAKEMAN. *J. Biol. Chem.*, **33** (1918), 7.
- (12) L. LINDERSTROM-LANG et S. KODAMA. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **16** (1925), n° 1.
- (13) L. LINDERSTROM-LANG. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **17** (1929), n° 9.
- (14) H. HOLTER. *Biochem. Z.*, **255** (1932), 160.
- (15) J. ALEXANDER. *8th Int. Cong. Appl. Chem.*, **4** (1912), 12.
- (16) Hs. NITSCHMANN et W. LEHMANN. *Helv. Chim. Acta*, **30** (1947), 804.
- (17) a) E. CHERBULIEZ et M. C. SCHNEIDER. *Helv. Chim. Acta*, **15** (1932), 597.
b) E. CHERBULIEZ et F. MEYER. *Helv. Chim. Acta*, **16** (1933), 600.
- (18) E. CHERBULIEZ et J. JANNERAT. *Helv. Chim. Acta*, **22** (1939), 959.
- (19) E. CHERBULIEZ et P. BAUDET. *Helv. Chim. Acta*, **33** (1950), 1673.
- (20) T. SVEDBERG, L. M. CARPENTER et D. C. CARPENTER. *J. Am. Chem. Soc.*, **52** (1930), 241 et 701.
- (21) O. MELLANDER. *Biochem. Z.*, **300** (1939), 240.
- (22) R. C. WARNER. *J. Am. Chem. Soc.*, **66** (1944), 1725.
- (23) N. J. HIPP, M. L. GROVES, J. H. CUSTER et T. L. McMEEKIN. *J. Dairy Sci.*, **35** (1952), 272.
- (24) N. J. BERRIDGE. *Nature*, **149** (1942), 194.
- (25) N. J. BERRIDGE. *Biochem. J.*, **39** (1945), 179.
- (26) C. ALAIS, G. MOCQUOT, Hs. NITSCHMANN et P. ZÄHLER. *Helv. Chim. Acta*, **36** (1953), 1955.
- (27) Hs. NITSCHMANN et H. U. BOHREN. *Helv. Chim. Acta*, **38** (1955), 1953.
- (28) Hs. NITSCHMANN et W. KELLER. *Helv. Chim. Acta*, **38** (1955), 942.
- (29) N. L. SÜHNGEN, K. T. WERINGA et A. PASVEER. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **56** (1937), 280.
- (30) T. TSUGO et K. YAMAUCHI. XIV^e Congrès Intern. Lait. (1956), vol. II, part II, 588.
- (31) C. L. HAKINSON et L. S. PALMER. *J. Dairy Sci.*, **26** (1943), 1043.
- (32) H. MATTENHEIMER et Hs. NITSCHMANN. *Helv. Chim. Acta*, **38** (1955), 687.
- (33) C. A. ZITTLE et J. CERBULIS. *J. Dairy Sci.*, **41** (1958), 241.
- (34) T. L. McMEEKIN. In « *The Proteins* » (Edit. E. Neurath et K. Bailey), New York (1954), vol. II, part A.
- (35) R. ASCHAFFENBURG. *J. Dairy Res.*, **23** (1956), 135.
- (36) D. F. WAUGH et P. H. v. HIPPEL. *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956), 4576.
- (37) T. L. McMEEKIN, M. L. GROVES et N. J. HIPP. 131st. Meeting of the Am. Chem. Soc. (1957), 65 c.
- (38) N. J. HIPP, M. L. GROVES et T. L. McMEEKIN. 136st Meeting of the Am. Chem. Soc. (1959), 56.
- (39) J. LONG, Q. WINCKEL et I. A. GOULD. *J. Dairy Sci.*, **41** (1958), 317.
- (40) D. F. WAUGH. *Faraday Soc. Discussions*, **25** (1958), 186.
- (41) J. GARNIER. *Proc. Intern. Symposium Enzyme Chem. Tokyo* (1957), 525.
- (42) R. G. WAKE. *Austr. J. Science*, **20** (1957), 167.
- (43) Hs. NITSCHMANN et R. HENZI. *Helv. Chim. Acta*, **52** (1959), 1985.

- (44) E. SUTERMEISTER et F. L. BROWNE. « Casein and its Industrial applications » (Reinhold Publ. Edit.) New York (1939).
- (45) O. HAMMARSTEIN et S. G. HEDIN. « Textbook of Physical Chemistry » (John Wiley Edit.) New York (1914).
- (46) L. L. VAN SLYKE. Proc. World Dairy Congress, **2** (1923), 1145.
- (47) D. B. JONES et C. E. F. GERSDORFF. J. Biol. Chem., **104** (1934), 99.
- (48) E. J. COHN et J. L. HENDRY. « Organic Syntheses », vol. 10 (John Wiley Edit.) New York (1930).
- (49) M. G. ENGEL et F. L. ENGEL. J. Biol. Chem., **167** (1947), 535.
- (50) R. G. WAKE. Austr. J. Biol. Sci., **12** (1959), 538.
- (51) H. A. MCKENZIE et R. G. WAKE. Biochim. Biophys. Acta, **47** (1961), 240.
- (52) P. SIMONART et K. Y. CHOW. Neth. Milk Dairy J., **6** (1952), 206.
- (53) N. J. BERRIDGE, J. G. DAVIS, P. M. KON et F. R. SPRATLING. J. Dairy Res., **13** (1943), 145.
- (54) N. J. BERRIDGE et C. WOODWARD. J. Dairy Res., **20** (1953), 255.
- (55) B. J. HOLWERDA. Lait, **3** (1923), 765.
- (56) B. van der BURG et A. F. van der SCHEER. C. R. V^e Congrès Intern. techn. et chim. ind. Agric., **2** (1937), 321.
- (57) N. J. BERRIDGE. Milchwissenschaft, **10** (1955), 195.
- (58) P. GRABAR et C. WILLIAMS. Biochim. Biophys. Acta, **10** (1953), 193; **17** (1955), 67.
- (59) C. ALAIS, P. GRABAR et G. CHRISTOL. Proc. Intern. Sympos. Enzyme Chemistry, Tokyo (1957), 523.
- (60) STORCH et SEGELKE. Milchzeitung, **3** (1874), 997, dans PORCHER (9).
- (61) F. SOXHLET. Milchzeitung, **6** (1877), 495 et 513.
- (62) B. FOLTMANN. Acta Chem. Scand., **13** (1959), 1927 et 1936.
- (63) N. J. BERRIDGE. Analyst, **77** (1952), 57.
- (64) L. LORAND. Biochem. J., **52** (1952), 200.
- (65) G. L. MILLS. Anal. Chim. Acta, **7** (1952), 70.
- (66) A. FRIEDRICH. « Microanalyse Organique Quantitative », trad. A. LACOURT, p. 140 (DUNOD Edit.), Paris (1939).
- (67) G. FOUILLOUZE. « Chimie Qualitative et Quantitative Appliquée », p. 302 et 389, Lyon (1951).
- (68) R. F. MILTON et W. A. WATERS. « Methods of quantitative micro-analysis » (Edward Arnold Publ.), Londres (1955).
- (69) S. J. ROWLAND. J. Dairy Sci., **9** (1938), 42.
- (70) A. F. BRIGGS. J. Biol. Chem. **59** (1924), 255.
- (71) E. BAMANN, E. NOVOTNY et L. ROHR. Chem. Ber., **81** (1948), 438.
- (72) E. L. RICHARDS. J. Dairy Res., **26** (1959), 53.
- (73) H. E. SCHULZE, R. SCHMIDTBERGER et H. HAUPT. Biochem. Z. **329** (1958), 490-507.
- (74) S. M. PARTRIDGE. 1/Biochem. J., **42** (1948) 238 et 251.
2/Nature, **164** (1949), 443.
- (75) C. J. RONDLE et W. T. J. MORGAN. Biochem. J., **61** (1955), 586.
- (76) P. J. STOFFY et R. W. JEANLOZ. Arch. Biochem. Biophys., **52** (1954), 373.
- (77) C. ALAIS et P. JOLLÈS. Biochim. Biophys. Acta, **51** (1961), 315.
- (78) P. ZILLIKEN et M. W. WHITEHOUSE. In « Advances in carbohydrate chemistry » vol. 13, p. 246 (Academic Press Publ.), New York (1958).
- (79) L. SVENNERHOLM. Acta Chem. Scand. **12** (1958), 547.
- (80) D. AMINOFF. Virology, **7** (1959), 355.
- (81) L. WARREN. J. Biol. Chem., **234** (1959), 1971.
- (82) G. BLIX. Z. Physiol. Chem., **240** (1936), 43.
- (83) B. RIBADEAU DUMAS et C. ALAIS. Bull. Soc. Chim. Biol., **43** (1961), 377.
- (84) E. MARTENSON, A. RAAL et L. SVENNERHOLM. Biochim. Biophys. Acta, **30** (1958), 124.
- (85) E. SVENNERHOLM et L. SVENNERHOLM. Nature, **181** (1958), 1154.
- (86) E. WIEDEMANN. Helv. Chim. Acta, **35** (1952), 82.
- (87) E. WIEDEMANN. Schweiz. Med. Wochenschr., **76** (1946), 241.
- (88) W. GRASSMANN et K. HANNIG. Naturwiss., **37** (1950), 496.
- (89) H. G. KUNKEL et A. TISELIUS. J. Gen. Physiol., **35** (1951), 89.
- (90) R. P. RYLE, F. SANGER, L. F. SMITH et R. KITAI. Biochem. J., **60** (1955), 541.
- (91) E. LEDERER et M. LEDERER. « Chromatography », p. 86 (Elsevier Publ.), Amsterdam (1953).
- (92) C. H. W. HIRS. « Methods in Enzymology » **1**, p. 113, Colowick et Kaplan Edit. (Academic Press), New York, 1955.
- (93) C. H. W. HIRS, S. MOORE et W. H. STEIN. J. Biol. Chem., **219** (1956), 623.

- (94) J. JOLLÈS-THAUREAUX. Thèse, p. 23, Paris 1957.
- (95) S. MOORE et W. H. STEIN. *J. Biol. Chem.*, **211** (1954), 907.
- (96) H. G. BOMAN et L. E. WESTLUND. *Arch. Biochem. Biophys.*, **64** (1956), 217.
- (97) A. DREZE et A. de BOECK. *Arch. Intern. Physiol.*, **60** (1952), 201.
- (98) J. JOLLÈS-THAUREAUX, P. JOLLÈS et C. FROMAGEOT. *Biochim. Biophys. Acta*, **27** (1958), 298.
- (99) S. MOORE et W. H. STEIN. *J. Biol. Chem.*, **192** (1951), 663.
- (100) J. R. SPIES et D. C. CHAMBERS. *Anal. Chem.*, **21** (1949), 1249.
- (101) S. MOORE, O. H. SPACKMAN et W. H. STEIN. *Anal. Chem.*, **30** (1958), 1185.
- (102) K. A. PIEZ et L. MORRIS. *Anal. Biochem.*, **1** (1960), 187.
- (103) F. SANGER. *J. Biochem.*, **39** (1945), 511.
- (104) P. EDMAN. *Acta Chem. Scand.*, **4** (1950), 283, 700.
- (105) J. A. GLADNER et H. NEURATH. *Biochim. Biophys. Acta*, **9** (1952), 335.
- (106) J. WILLIAMS et F. SANGER. *Biochim. Biophys. Acta*, **33** (1959), 294.
- (107) A. GOTTSCHALK. « The Zzymes », Vol. IV, Academic Press, New York (1960), p. 461.
- (108) N. J. HIPP, J. J. BASCH et W. G. GORDON. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94** (1961), 35.
- (109) T. A. J. PAYENS. *Biochim. Biophys. Acta*, **46** (1961), 441.
- (110) R. ASCHAFFENBURG. *Nature*, **192** (1961), 4801.
- (111) Hs. NITSCHMANN et H. ZÜRCHER. *Helv. Chim. Acta*, **33** (1950), 1698.
- (112) T. HOFMANN. *Nature*, **181** (1958), 634.
- (113) R. G. WAKE et R. L. BALDWIN. *Biochim. Biophys. Acta*, **47** (1961), 225.
- (114) B. RIBADEAU DUMAS. *Biochim. Biophys. Acta*, **54** (1961), 400.
- (115) H. A. MCKENZIE et R. G. WAKE. *Austr. J. Chem.*, **12** (1959), 734.
- (116) P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS. *Arch. Biochem. Biophys.*, **98** (1962), 56.
- (117) C. ALAIS et P. JOLLÈS. *Nature* (sous presse).
- (118) C. F. JACOBSEN. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Chim.*, **25** (1947), 327.
- (119) Hs. NITSCHMANN et P. NAGELI, dans P. NAGELI. Thèse, Berne (1951).
- (120) Hs. NITSCHMANN, H. WISSMANN et R. HENZL. *Chimia*, **11** (1957), 76.
- (121) P. JOLLÈS et C. ALAIS. *Biochim. Biophys. Acta*, **34** (1959), 565.
- (122) H. A. SOBER et E. A. PETERSON. In « Amino acids, Proteins and Cancer Biochemistry », p. 71 (J. P. Greenstein Edit.), New York (1960).
- (123) P. JOLLÈS et C. ALAIS. *Compt. rend.*, **251** (1960), 6205.
- (124) P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS. *Biochim. Biophys. Acta*, **51** (1961), 309.
- (125) A. GOTTSCHALK et D. H. SIMMONDS. *Biochim. Biophys. Acta*, **42** (1960), 141.
- (126) P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS. *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- (127) T. TSUGO et K. YAMAUCHI. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **24** (1960), 96.
- (128) T. M. MCMEEKIN, N. J. HIPP et M. L. GROVES. *Arch. Biochem. Biophys.*, **83** (1959), 35.
- (129) R. J. WINZLER. In *The plasma Proteins* » (F. W. PUTMANN Edit.), Academic Press, New York (1960), 309-341.
- (130) R. A. GIBBONS et G. C. CHEESEMAN. *Biochim. Biophys. Acta*, **56** (1962), 354.
- (131) B. JOHANSSON et L. SVENNERHOLM. *Acta Physiol. Scand.*, **37** (1956), 324.
- (132) L. REYNOLDS, G. O. HENNEBERRY et B. E. BAKER. *J. Dairy Sci.*, **42** (1959), 1463.
- (133) H. MASAMUNE. *J. Biol. Chem.*, **26** (1937), 223.
- (134) E. F. MELLON, A. H. KORN et S. R. HOOVER. *J. Am. Chem. Soc.*, **75** (1953), 1675.
- (135) H. WISSMANN et Hs. NITSCHMANN. *Helv. Chim. Acta*, **40** (1957), 356.
- (136) C. M. ISE. *Diss. Abs.*, **19** (1958), 431.
- (137) N. SENO, K. MURAI et K. SHIMURA. *J. Biochem. Japan*, **42** (1955), 169.
- (138) W. MANSON. *Nature*, **184** (1959), 1393 et *Arch. Biochem. Biophys.*, **95** (1961), 336.
- (139) A. GOTTSCHALK et E. R. B. GRAHAM. *Biochim. Biophys. Acta*, **34** (1959), 380.
- (140) E. R. B. GRAHAM et A. GOTTSCHALK. *Biochim. Biophys. Acta*, **33** (1960), 513.
- (141 a) E. A. POPENOE. *Biochim. Biophys. Acta*, **32** (1959), 584.
- (141 b) R. W. JEANLOZ. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42** (1960), 303.
- (142) A. ROSENBERG et E. CHARGAFF. *Biochim. Biophys. Acta*, **42** (1960), 357.
- (143) A. GOTTSCHALK et M. A. W. THOMAS. *Biochim. Biophys. Acta*, **46** (1961), 91.
- (144) J. W. ROSEVEAR et E. L. SMITH. *J. Am. Chem. Soc.*, **80** (1958), 250.
- (145) M. H. MANDELSTAMM et J. L. STROMINGER. *Biochem. Res. Comm.*, **5** (1961), 466.
- (146) Hs. NITSCHMANN et R. BEEBY. *Chimia*, **14** (1960), 318.
- (147) W. HABERMANN, H. MATTENHEIMER, H. SKY-PECK et M. SINOHARA. *Chimia*, **15** (1961), 339.

- (148) C. PORCHER, H. VOLKRINGER et J. BRIGANDO. *Lait*, **14** (1934), 1041.
- (149) I. S. VERMA et F. H. GRIMBLEY. *J. Dairy Sci.*, **43** (1960), 856.
- (150) S. POSTERNAK. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **187** (1928), 313.
- (151) C. H. VERDIER. *Nature*, **170** (1952), 804.
- (152) S. F. de St. GROTH. *Biochim. Biophys. Acta*, **46** (1961), 98.
- (153) D. F. WAUGH. *Abs. Pap. Am. Chem. Soc.*, April 1959, 49 c.
- (154) Hs. NITSCHMANN et R. VARIN. *Helv. Chim. Acta*, **34** (1951), 1421.
- (155) J. GARNIER, G. MOCQUOT et G. BRIGNON. *Comptes rendus*, **254** (1962) 372.
- (156) R. G. WAKE. *Austr. J. Biol. Sci.*, **12** (1959), 479.
- (157) J. C. FISH. *Nature*, **180** (1957), 345.
- (158) P. DESNUELLE et M. ROVERY. *III^e Congr. Intern. Biochim. Bruxelles* (1955), 78.
- (159) P. DYATCHENKO. *Molotchnaya Promychnennost*, **18** (1957), 33.
- (160) R. M. de BAUN, W. R. CONNOR et R. A. SULLIVAN. *Arch. Biochem. Biophys.*, **43** (1953), 324.
- (161) H. E. WEIMER, J. W. MEHL et R. J. WINZLER. *J. Biol. Chem.*, **185** (1960), 561.
- (162) J. M. GHUYSEN. *Biochim. Biophys. Acta*, **50** (1961), 413.
- (163) J. R. BRUNNER et M. P. THOMPSON. *J. Dairy Sci.*, **42** (1959), 1881.
- (164) H. SCHWANDER, P. ZÄHLER et Hs. NITSCHMANN. *Helv. Chim. Acta*, **35** (1952), 553.
- (165) C. A. ERNSTROM. *J. Dairy Sci.*, **41** (1958), 1663.
- (166) B. FOLTMANN. *Acta Chem. Scand.* **14** (1960), 2059.
- (167) J. GARNIER. *Ann. Technol. (I. N. R. A.)*, **3** (1957), 245.
- (168) W. KELLER. *Dissertation*, Bern (1954).
- (169) M. IMADO, S. NAKAI, F. TSUCHUGA et K. MIYAZAWA. *Japan J. Zootechn. Sci.*, **30** (1959), 242 et 248.
- (170) J. CERBULIS, J. H. CUSTER et C. A. ZITTLE. *Arch. Biochem. Biophys.*, **84** (1959), 417.
- (171) B. LINDQVIST et T. STORGARD. *Acta Chem. Scand.*, **14** (1960), 1432.
- (172) M. OHEDA. *Japan J. Zootechn. Sci.*, **27** (1956), 81.
- (173) T. TSUGO. *Japan Zootechn. Sci.*, **25** (1954), 6 et **26** (1955), 173.
- (174) T. TSUGO et K. YAMAUCHI. *XV^e Inten. Congr. Londres* (1959), 636.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

ÉTUDE COMPARÉE DE LA COAGULATION ENZYMATIQUE DU SANG ET DU LAIT

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 2 juin 1962

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Marc ZAMANSKY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand Cher, France. — 1-1963.

Dépôt légal : 1^{er} trimestre 1963

N^o d'impression : 206

